Untersuchungen über tRNA-Methyltransferasen bei Apis mellifica unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung bei Königin und Arbeiterin

Heinrich Henschel

München
1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546015_0070

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
(Direktor: Professor Dr. A. Butenandt)

Untersuchungen über tRNA-Methyltransferasen bei Apis mellifica unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung bei Königin und Arbeiterin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von

Heinrich Henschel
aus
Tschenstochau

1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Privatdozent Dr. H. Rembold
2. Referent: Professor Dr. A. Butenandt
3. Referent: Professor Dr. H. Autrum

Tag der mündlichen Prüfung: 7.7.1971

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. H. Rembold durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt danke ich sehr herzlich für die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Rembold bin ich für sein stetiges Interesse und für zahlreiche Diskussionen und Anregungen dankbar.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Der enzymatische Test	6
2.1	pH-Abhängigkeit der Methyltransferasenaktivität	7
2.2	Enzymabhängigkeit der Reaktion	8
2.3	Zeitabhängigkeit der Reaktion	9
2.4	Substratabhängigkeit der Reaktion	10
2.5	S-Adenosyl-L-Methioninabhängigkeit	11
3.	Entwicklungsabhängige tRNA-Methyltransferasenaktivität bei Apis mel.	13
3.1	Aktivität gegenüber $tRNA_{E.\ coli}$	13
3.2	Aktivität gegenüber $tRNA_{Apis}$ aus verschiedenen Entwicklungsstadien (Kreuztest)	17
4.	Untersuchungen zum Spezifitätsunterschied zwischen Königinnen- und Arbeiterinnen-tRNA-Methyltransferasen aus dem gleichen Entwicklungsstadium	20
5.	Diskussion	29
6.	Zusammenfassung	35
7.	Experimenteller Teil	37
7.1	Züchtung der Bakterien	37
7.2	Gewinnung von E. coli-tRNA	37
7.3	Eigenschaften dieser tRNA	39
7.4	Tiermaterial	39
7.5	Gewinnung von Bienen-tRNA	40
7.6	Eigenschaften der Bienen-tRNA	40
7.7	Verwendete Pufferlösungen	41

Seite

7.7.1 Tris-HCl-Puffer 41
7.7.2 Veronal-Acetat-Puffer 41
7.7.3 TMA-Puffer 41
7.7.4 Ammoniumformiat-Puffer 42
7.8 Methyldonormischung 42
7.9 Präparation der tRNA-Methyltransferasen-fraktion 42
7.10 Durchführung der Methylierungstests 43
7.11 Berechnung des Einbaus 44
7.12 Radioaktivitätszählung im Flüssigkeitszähler 44
7.13 Vorbehandlung der Chromatographiesäulen 46
7.13.1 Säulenpräparation 46
7.13.2 Regenerieren des Säulenmaterials 46
7.13.3 Säulenchromatographie 47
7.14 Durchführung des Tests zur Feststellung von Spezifitätsunterschieden der tRNA-Methyl-transferasen bei Arbeiterin und Königin 47
7.14.1 Rückgewinnung der Nucleinsäure 48
7.14.2 Enzymatische Spaltung 48
7.14.2.1 Spaltung der Nucleinsäure mit T_1-RNase 48
7.14.2.2 Phosphomonoesterasespaltung 48
7.14.2.3 Phosphodiesterasespaltung 49
7.14.3 Auftrennung der Nucleotide 49
7.14.4 Entsalzung der Nucleotide 49
7.14.5 Hochspannungs-Papierelektrophorese 50
7.14.6 Elution der Elektrophoreseflecken 50
7.14.7 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie 51
7.15 Spektrophotometrie 51
7.16 Autoradiographie 51
7.17 Spezielles 52

Literaturverzeichnis 53

1. Einleitung

Aus den Arbeiten von HOAGLAND et al. (32, 256f, 1958), BERG u. OFENGAND (8, 79ff, 1958) und NIRENBERG et al. (50, 105ff, 1962) ist die Funktion der tRNA[+)] - früher auch sRNA[++)] genannt - als leichtlöslicher, codongemäßer Aminosäureüberträger für die Biosynthese von Polypeptidketten bekannt. Nucleotiduntersuchungen zeigten, daß neben den in der tRNA auftretenden Basen Adenin, Guanin, Uracil und Cytosin in geringen Mengen auch methylierte Basen vorkommen (DUNN et al. 20, 113ff, 1960), deren Methylgruppen aus Methionin stammen (MANDEL u. BOREK 47, 138ff, 1961). Bei der Strukturaufklärung verschiedener Spezies wurden weitere Modifizierungen der tRNA festgestellt (ZACHAU 79, 647f, 1969). Ein möglicher Einfluß der seltenen Nucleoside auf die Eigenschaften der tRNA wurde unter den verschiedensten Aspekten untersucht. Bei einem Spektrum vielfältiger Ergebnisse konnte man dabei zwar für den Einzelfall Aussagen machen, sie aber nur in wenigen Fällen verallgemeinern. Eine generelle Linie war bei Untersuchung der modifizierenden Enzyme leichter zu finden. Es stellte sich heraus, daß die tRNA-Methyltransferasen (Gruppe der C1-Gruppen übertragenden Enzyme: E.C.[+++)] 1.1.2) art- und basenspezifisch sind (SRINIVASAN u. BOREK 67, 530f, 1963), daß ihre Aktivität in Krebszellen höher ist, als in normalen Gewebszellen (BERGQUIST u. MATTHEWS 10, 568, 1959; SILBER et al. 63, 638ff, 1966) und daß die Methylierung irreversibel ist.

+) tRNA = transfer ribonucleic acid

++) sRNA = soluble ribonucleic acid

+++) E.C. = Enzyme Code

Die Differenzierung der verschiedenen Organe eines Organismus ist genetisch durch Organisatorgene und Regulation festgelegt. Sie läuft sehr komplex und wenig durchschaubar ab. Nach abgeschlossener Differenzierung üben die Organe spezifisch verschiedene Funktionen aus. Bei sozialen Insektenarten werden einige Funktionen, z.B. die der Fortpflanzung, Vorratswirtschaft, Verteidigung, bevorzugt auf verschiedene Individuen, sog. Kasten, verteilt. Die Differenzierung geht also hier über das Niveau eines Organismus hinaus. Sie erfolgt innerhalb eines Insektenstaates, wobei der Differenzierungsgrad jeder Kaste, wie auch bei den Organen, genetisch festgelegt ist. Die Entscheidung, ob aus einem Ei schließlich ein Individuum der einen oder anderen Kaste entsteht, fällt durch den Einfluß äußerer Umstände (LÜSCHER 44, 168f, 1969; SCHMIDT 62, 260f, 1969; REMBOLD u. HANSER 58, 251f, 1964). Zumindest bei einigen staatenbildenden Insekten wird also während der Entwicklung von außen her in den Vorgang der Morphogenese eingegriffen.

Bei Apis mellifica entwickelt sich ein befruchtetes Ei nur dann zu einer Bienenkönigin, wenn die junge Larve zwischen dem 4. und 6. Tag nach Eiablage mit dem im Weiselfuttersaft enthaltenen Determinationsstoff gefüttert wird (REMBOLD u. HANSER 58, 251f, 1964). Andernfalls wird das Tier eine Arbeiterin, die sich morphologisch-histologisch in vielfacher Hinsicht von einer Königin unterscheidet (SNODGRASS 66; 36, 57, 97, 109ff, 148ff, 287f, 298ff (1956)). Die Tatsache, daß auch aus Bombyx mori-Extrakten ein Königinnen determinierender Stoff angereichert werden konnte (REMBOLD 59a, 1969; 59b, 239, 1969), stützt die Hypothese REMBOLDs, daß die zwei- bis dreitägigen Bienenlarven durch genetisch bedingten Hormonmangel zu Arbeiterinnen werden.

Vergleichende biochemische Untersuchungen zeigten erwartungsgemäß Kastenunterschiede (OSANAI u. REMBOLD 51, 22ff, 1968; CZOPPELT u. REMBOLD 19, 1249ff, 1970), die entwick-

lungsabhängig sind und auf eine ganze Reihe kastenspezifischer Proteine hinweisen. Eines konnte angereichert und immunologisch charakterisiert werden (GRAF 27, (1970)). Diese andersartigen Proteine der Königin entstehen als Folge des in einer sensiblen Entwicklungsphase aufgenommenen Determinationsstoffs. Er oder seine Metabolite könnten nach den bisherigen Erkenntnissen in die Proteinbiosynthese eingreifen, wie es im folgenden Schema gezeigt ist.

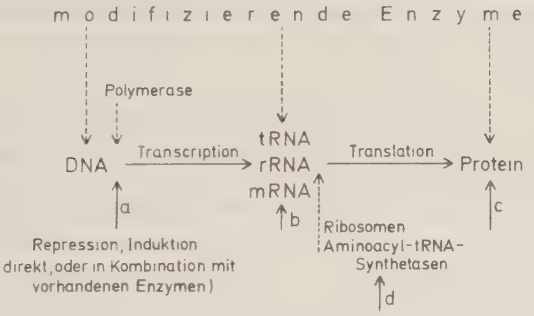


Abb. 1: Schema für Steuerungsmöglichkeiten bei der Proteinbiosynthese. Ausgezogene Pfeile (a bis d): mögliche direkte Beeinflussung durch den Determinationsstoff oder seine Metabolite; gestrichelte Pfeile: mögliche Beeinflussung durch Proteine oder RNAs, die bereits durch Regulation auf der Stufe a, b, c oder/und d neu synthetisiert sind.

Da der Determinationsstoff in seiner Struktur noch nicht aufgeklärt und deshalb keine radioaktive Markierung möglich ist, können die ausgezogenen Pfeile des Schemas nicht nachgeprüft werden. Man ist also zunächst auf eine Untersuchung von Sekundäreffekten (gestrichelte Pfeile des Schemas) angewiesen.

Für den Transkriptionsschritt ist Regulation durch CLEVER und KARLSON (18, 623ff, 1960) für den Translationsschritt wegen

Modifikation der tRNA nach Phageninfektion (SUEOKA et al. 71, 571, 1966) und durch Ergebnisse von SILBERT et al. (64, 344f, 1966) wahrscheinlich gemacht.

Mit großer Wahrscheinlichkeit erhält die tRNA ihre funktionsfähige Form erst kurz vor ihrer Verwendung in der Proteinbiosynthese durch eine chemische Modifikation. Für diese Annahme spricht u.a., daß die tRNA

1. nur in Ausnahmefällen (Mangelmedium und gleichzeitig relaxed control (MANDEL u. BOREK 46, 15ff, 1961; STENT u. BRENNER 69, 2006ff, 1961)) oder ganz kurze Zeit nach Neusynthese (Prae-tRNA ist bereits teilweise modifiziert (BERNHARDT u. DARNELL 12, 48, 1969)) unmodifiziert vorliegt;
2. ausschließlich in makromolekularem Zustand modifiziert wird (FLEISSNER u. BOREK 24, 1200ff, 1962) und
3. sehr langlebig ist (GROSS, mündl. Mitt.). Sie könnte im Laufe der Zeit innerhalb des Organismus sogar mehrmals modifiziert werden.

Jede im Transkriptionsschritt neu synthetisierte tRNA wird also unabhängig von der Regulation, der sie vorher unterworfen war (vgl. Schema 4), modifiziert.
Daß die tRNA erst durch die Modifikation funktionsfähig wird, ist sehr unwahrscheinlich. Unmodifizierte tRNA kann mit einem CCA_{OH}-Ende beladen werden und an Codons und Ribosomen binden (STARR 68, 182f, 1963; PETERKOFSKY et al. 54, 2925, 1964; REVEL u. LITTAUER 60, 391ff, 1966; CARPA u. PETERKOFSKY 16, 458ff, 1966). Außerdem wurde nach Modifikation der eingesetzten tRNA keine Änderung in der Aminosäuresequenz der in vitro synthetisierten Polypeptidkette festgestellt (MORRIS et al. 48, 261f, 1970). Die Autoren diskutieren einen eventuellen Einbau von Arginin- und Serinderivaten durch anders modifizierte $tRNA^{arg}$ und $tRNA^{ser}$ +. Trotz

---

+ arginin- bzw. serinspezifische tRNA (IUPAC-IUB)

dieser beiden Tatsachen wird jede im Transkriptionsschritt neu synthetisierte tRNA ungeachtet ihrer vorher erfolgten Regulation modifiziert. Möglicherweise wird die Nucleinsäure damit besser vor einem Angriff durch Nucleasen geschützt (PACE et al. 52, 1197, 1970). Schließlich wäre es möglich, daß durch die Methylierung tRNAs entstehen, die in der Lage sind, spezifische Codons der mRNA zu erkennen und durch ihr Entstehen regelnd in die Proteinbiosynthese einzugreifen. Die Aktivität der Methyltransferasen ist in den verschiedenen Organen unterschiedlich hoch (BERGQUIST u. MATTHEWS 11, 309, 1962; SRINIVASAN u. BOREK 67, 530, 1963; sowie CHRISTMAN u. BOREK 17, 867, 1967) und schwankt entwicklungsabhängig, wie z.B. bei Säugern (SIMON et al. 65, 103, 1967; HANCOCK et al. 30, 806f, 1967; KAYE u. LEBOY 36, 294, 1968) oder Insekten (BALIGA et al. 6, 555ff, 1965) nachgewiesen wurde. Durch eine Untersuchung der tRNA-Methyltransferasen bei Apis mellifica sollte nun die Spezifität von tRNA-modifizierenden Enzymen sowohl unter dem Einfluß von Hormonen des jeweiligen Individuums als auch unter der Regulation durch den Determinationsstoff festgestellt werden. Eine Möglichkeit, tRNA in vitro zu modifizieren, ist mit ihrer enzymatischen Methylierung durch tRNA-Methyltransferasen gegeben. Das Ausmaß der Methylierung läßt in Grenzen Rückschlüsse auf das Ausmaß des Modifikationsgrades der verwendeten tRNA zu.

In dieser Arbeit soll im einzelnen folgendes geklärt werden:

a) Gibt es Unterschiede in der Aktivität der tRNA-Methyltransferasen im Laufe der Entwicklung von Apis mellifica?

b) Gibt es Unterschiede in der Aktivität der tRNA-Methyltransferasen zwischen Arbeiterin und Königin?

c) Gibt es Unterschiede in der Spezifität der tRNA-Methyltransferasen zwischen Arbeiterin und Königin? Man müßte dann spezifische Stellen im tRNA-Molekül finden, wo Arbeiterinnenmethyltransferasen eine fremde tRNA methylieren können und Königinnenmethyltransferasen nicht, und umgekehrt.

2. Der enzymatische Test

Für Methylierungstests ist eine möglichst unmodifizierte tRNA besonders geeignet. Es wurde der Stamm $K_{12}met^{-}RC^{rel}$ von E. coli gewählt, welcher, wie in Kapitel 7.1 beschrieben, auf Vollmedium und auf Methionin-Mangelmedium gezüchtet wurde. Die tRNA wurde sowohl aus auf Vollmedium (weiterhin als Normal-$tRNA_{E.\ coli}^{+}$ bezeichnet), als auch aus auf Mangelmedium (weiterhin als Methylmangel-$tRNA_{E.\ coli}$ bezeichnet) gewachsenen Bakterien gewonnen und diente als Substrat für die Übertragung der ^{14}C-markierten Methylgruppen aus S-Adenosyl-L-Methionin (SAM). Als Methylgruppenüberträger fungierten Bienenenzyme.

Die Gesamtreaktion kann folgendermaßen zusammengefaßt werden[++] (HURWITZ u.a. 33, 3462, 1964):

$$(^{14}C\text{-Methyl})\text{-SAM} + \text{tRNA} \xrightarrow{\text{tRNA-Methyl-transferasen}} (^{14}C\text{-Methyl})\text{-tRNA} + \text{SAH}$$

Diese Reaktion wird durch eine hohe SAM-Konzentration und durch das entstehende SAH gehemmt (HURWITZ et al. 34, 3481f, 1964).

In der von BALIGA et al. (6, 555, 1965) für Extrakte aus Tenebrio molitor angegebenen Weise verlief der Methylierungstest mit Bienenenzymen negativ. Es mußte deshalb erst ein geeigneter Inkubationsansatz für die Auswertung der Bienenextrakte gefunden werden.

Da es verschiedene tRNA-Methyltransferasen gibt (2, 3464ff), könnten sich ihre einzelnen optimalen Reaktionsbedingungen entwicklungsabhängig ändern, sei es durch das Altern der Tiere oder durch eine Änderung im Spektrum der tRNA-Methyl-

---

+ $tRNA_{E.\ coli}$ = Gemisch der tRNAs aus E. coli (Abkürzung nach den Vorschlägen der IUPAC-IUB)

++ SAM = S-Adenosyl-L-Methionin; SAH = S-Adenosyl-L-Homocyste

transferasen. Deshalb wurden für die Tests, die zur Auffindung der günstigsten Inkubationsbedingungen dienten, Extrakte aus einem Gemisch aller Entwicklungsstadien der Arbeiterin verwendet.

Nach einigen Vorversuchen erwies sich die in Tabelle 1 angegebene Puffermischung als die geeignetste. Pro Ansatz wurde ein Gemisch aus 0,25 ml m/37,8 Veronal-Acetat-Puffer, 0,05 ml m/100 Tris-HCL-Puffer und 0,04 ml m/100 TMA-Puffer eingesetzt (vgl. Kap. 7.7).

		Molarität x 10^{-3}
0.9 µMol	Tris	2,6
0.4 µMol	Magnesiumacetat x $4H_2O$	1,2
6.6 µMol	Natriumacetat	19,4
6.6 µMol	Diäthylbarbitursaures Natrium	19,4
26.9 µMol	NaCl	79,2
0.8 µMol	NH_4Cl	2,4
1.0mµMol	EDTA	2,9 x 10^{-3}
2.0 µMol	2-Merkaptoäthanol	6,0
	Gesamtvolumen: 0,34 ml pH 7,6	

Tabelle 1: Inkubationspuffer für Methylierungsansätze

Anschließend wurden die Parameter der Inkubationsmischung nacheinander variiert.

2.1 pH-Abhängigkeit der Methyltransferasenaktivität

Durch Veränderung des pH-Werts des Veronal-Acetat-Puffers wurde der pH-Wert der Inkubationen von 4 bis 9 variiert. Die tRNA-Methyltransferasenaktivität erreicht ein breites Optimum zwischen pH 6,5 und 8,4.

Die weiteren Inkubationen wurden deshalb bei pH 7,6 durchgeführt.

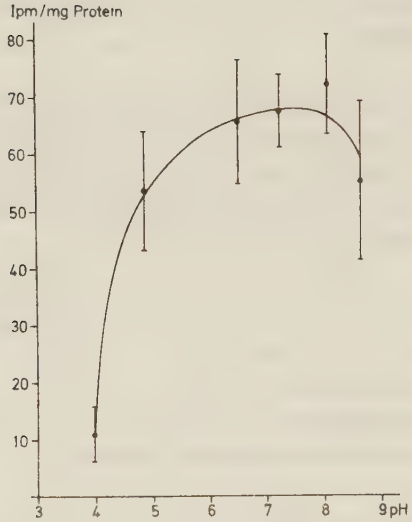


Abb. 2: pH-Abhängigkeit der tRNA-Methyltransferasenaktivität.

Ansatz: 0,34 ml Inkubationspuffer (Tab. 1), 0,125 mg Methylmangel-$tRNA_{E.\ coli}$; 2,2-4,3 mg Protein und 11,55 mµMol (^{14}C-Methyl)-SAM (4×10^4 Ipm). Inkubationszeit 40 Min bei 37°C. Die Streuung gibt, wie auch in weiteren Abbildungen, den mittleren Fehler des Mittelwertes (F_m) an (vgl. KÜSTER et al. 38, 188, 1962). Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY (43, 265ff, 1951).

2.2 Enzymabhängigkeit der Reaktion

Bei der Inkubation wurden Proteinmengen zwischen 0,8 mg und 15 mg eingesetzt. Der Einbau verläuft der eingesetzten Menge bis zu 10 mg proportional. Bei allen weiteren Versuchen wurden zwischen 2 und 5 mg Protein verwendet.

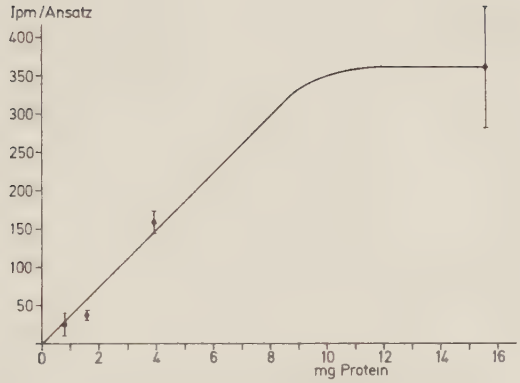


Abb. 3: Enzymabhängigkeit der tRNA-Methyltransferasen-aktivität. pH 7,6; sonstige Bedingungen wie in Abb. 2.

2.3 Zeitabhängigkeit der Reaktion

Variation der Inkubationszeit zwischen 20 Min. und 4 Std. führt nach 160 Min. zur Sättigung. Die Kurve (Abb. 3) zeigt, daß die Inkubationszeit für Tests bei mittlerem Sättigungsbereich 80 Min. betragen sollte. Alle weiteren Versuche wurden deshalb 80 Min. lang inkubiert.

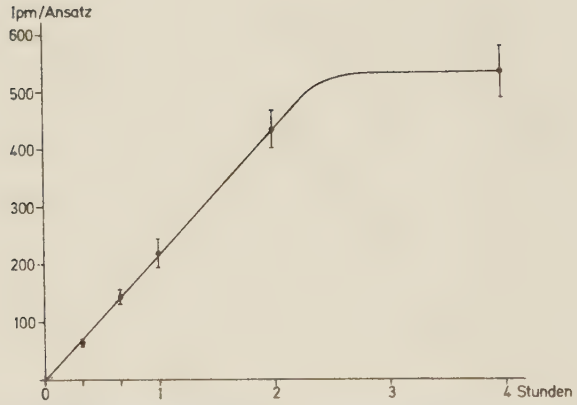


Abb. 4: Zeitabhängigkeit der tRNA-Methyltransferasen-aktivität. pH 7,6; andere Bedingungen wie in Abb. 2.

2.4 Substratabhängigkeit der Reaktion

Es wurden verschiedene Konzentrationen von tRNA (OD_{260nm} von 1-27) pro Ansatz eingesetzt. Wie die graphische Darstellung in Abb. 4 zeigt, muß tRNA von mindestens OD_{260nm}= 2,7 pro Test verwendet werden, damit das Substrat die Reaktion nicht limitiert. Diese Menge wurde in allen weiteren Versuchen nicht unterschritten. Eine vergleichende Untersuchung mit $tRNA_{Hefe}$ (BOEHRINGER) ergab, daß diese vom Gemisch der tRNA-Methyltransferasen aus Apis nicht so stark methyliert wird wie die $tRNA_{E. coli}$.

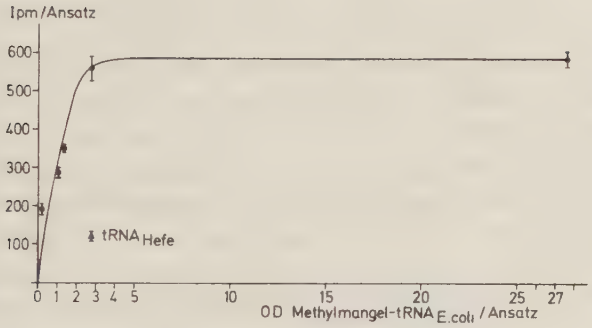


Abb. 5: Substratabhängigkeit der tRNA-Methyltransferasen-aktivität. pH 7,6; 3,6 mg Protein; 80 Min. Inkubationszeit; sonstige Bedingungen wie in Abb. 2.

2.5 S-Adenosyl-L-Methionin-Abhängigkeit

Pro Ansatz wurden steigende Mengen SAM (bis zu 116,2 mµMol) bei gleicher spezifischer Radioaktivität verwendet. Bereits bei 116,2 mµMol ist eine starke Hemmung erkennbar, so daß der Einbau der Methylgruppen sehr stark zurückgeht. In allen Aktivitätsuntersuchungen (Kapitel 3.) wurden deshalb nur 11,55 mµMol SAM pro 0,34 ml Inkubationsvolumen eingesetzt. Bei den Spezifitätstests (Kapitel 4.) waren es 34,65 mµMol SAM pro 0,34 ml Inkubationsvolumen.

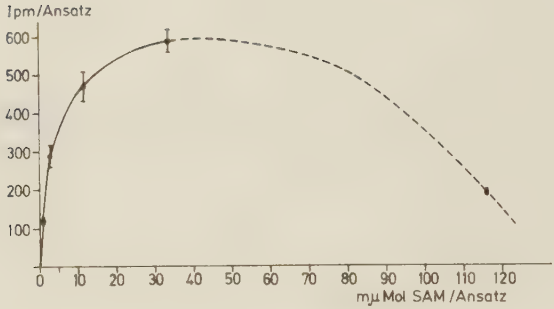


Abb. 6a: SAM-Abhängigkeit der tRNA-Methyltransferasenaktivität. 2,6 mg Protein; sonstige Bedingungen wie in Abb. 5.

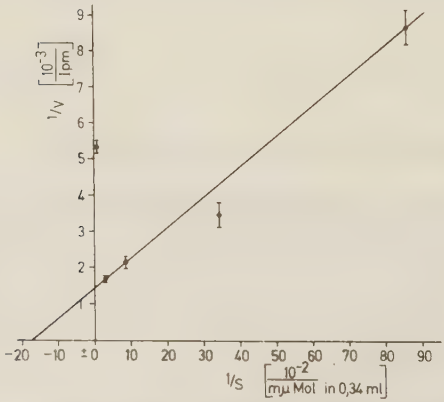


Abb. 6b: Bestimmung des K_m-Wertes nach LINEWEAVER-BURK (38, 658ff, 1934, s.a. LUMPER 45, 31f, 1964)

Nach dem bekannten Lineweaver-Burk-Verfahren ergibt sich ein K_m-Wert von 8,33 mμMol SAM pro 0,34 ml entsprechend $K_m = 2{,}5 \times 10^{-5}$ m.

3. Entwicklungsabhängige tRNA-Methyltransferasenaktivität bei Apis mel.

3.1 Aktivität gegenüber $tRNA_{E.\ coli}$

Es wurden 11 verschiedene Entwicklungsstadien der Arbeiterin und der Königin nach morphologischen Merkmalen ausgewählt. Ihre Zuordnung zum Entwicklungsalter ist in Tab. 2 zusammengestellt. Von jedem Stadium wurde der durch Zentrifugation des Homogenats bei 100000 xg gewonnene Überstand aus Arbeiterinnen und Königinnen auf seine tRNA-Methyltransferasenaktivität gegen Methylmangel-$tRNA_{E.\ coli}$ und in einigen Fällen gegen Normal-$tRNA_{E.\ coli}$ getestet.

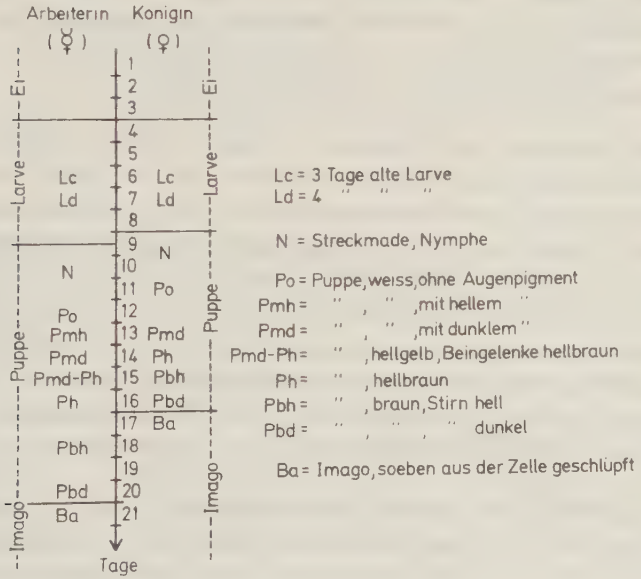


Tabelle 2: Vergleich der Entwicklungsstadien von Arbeiterinnen und Königinnen der Honigbiene, Apis mel. L.. Die Abkürzungen werden auch im Text dieser Arbeit verwendet, bei vorangesetztem "A" sind es die entsprechenden Entwicklungsstadien der Arbeiterin, bei vorangesetztem "K" die der Königin.

Nach den Ergebnissen in Abb. 7 nimmt die Aktivität der Königinnen und Arbeiterinnen bis zur beginnenden Melanisierung zu - etwas langsamer als nach entsprechenden Versuchen von BALIGA et al. (6, 556, 1965) bei Tenebrio - und fällt dann wieder ab. Auch die Aktivität gegenüber Normal-tRNA entspricht in den getesteten Fällen diesem Kurvenverlauf.
Das Ergebnis zeigt, daß die tRNA-Methyltransferasen von Apis die $tRNA_{E.\ coli}$ an anderen Stellen methylieren, als es die E. coli-Methyltransferasen tun. Eine Übermethylierung von Bakterien-RNA durch tRNA-Methyltransferasen höherer Organismen wurde schon früher veröffentlicht (SRINIVASAN u. BOREK 67, 530f, 1963; GOLD et al. 26, 165ff, 1963). Doch wurde das "Nicht-unterscheiden-können" zwischen Methylmangel- und Normal-$tRNA_{E.\ coli}$ durch höhere Organismen erst später bekannt (RODEH et al. 61, 454, 1967). Eine Übermethylierung von Normal-$tRNA_{E.\ coli}$ durch E. coli Enzyme ist nicht möglich (26, 166, 1963).

Die Aktivität der tRNA-Methyltransferasen von Arbeiterin und Königin unterscheidet sich zu Beginn und am Ende der Entwicklung kaum. Nur kurz vor der beginnenden Melanisierung (Pmh, Pmd) ist der Kastenunterschied signifikant (vgl. Abb. 7). Nach KAYE u. LEBOY (36, 299, 1968) beeinflussen einwertige Ionen die Aktivität der tRNA-Methyltransferasen. Da der Gehalt einwertiger Kationen in den verschiedenen Entwicklungsstadien aber praktisch konstant bleiben dürfte, ist ein Einfluß auf die gemessenen Einbauraten sehr unwahrscheinlich.

Die tRNA-Methyltransferasenaktivität steigt in beiden Kasten bis zu einem bestimmten Punkt der Entwicklung an. Eine solche Aktivitätszunahme kann zwei Ursachen haben.

1. Alle oder einzelne Methyltransferasen des vorhergehenden Entwicklungsstadiums werden aktiviert oder in größerer Menge synthetisiert. Die Folge ist eine Bildung genau

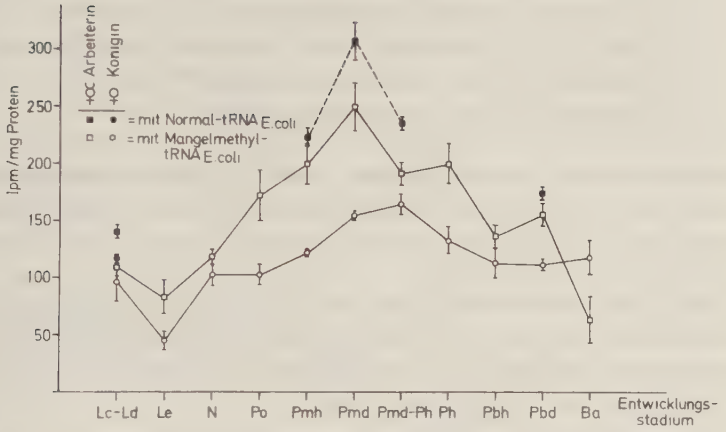


Abb. 7: tRNA-Methyltransferasenaktivität bei Arbeiterin und Königin. Pro Ansatz 1,5 - 3,9 mg Protein; sonstige Bedingungen wie in Abb. 5 angegeben. Das Protein wurde aus dem 100000 xg Überstand des Bienenextrakts mit Trichloressigsäure gefällt und nach LOWRY (43, 265ff, 1951) bestimmt.

der gleichen tRNA, wie im jüngeren Stadium, nur daß sie in einem kürzeren Zeitraum modifiziert wird (gleicher Modifikationsgrad).

2. Das Methyltransferasenspektrum wird qualitativ verändert unter gleichzeitiger Verminderung, Beibehaltung oder Steigerung der schon vorher vorhandenen Enzymaktivitäten. Die Folge ist eine Synthese anders modifizierter tRNA's, als sie im jüngeren Entwicklungsstadium vorkommen (anderer Modifikationsgrad).

Von der beginnenden Melanisierung an nimmt die Gesamtmethyltransferasenaktivität der Königin und Arbeiterin ab. Die Ursachen dafür könnten ganz entsprechend den eben diskutierten sein:

1. Es wird die Aktivität einzelner oder aller tRNA-Methyltransferasen aus den vorhergehenden Entwicklungsstadien herabgesetzt (Modifizierungsgrad bleibt gleich).
2. Einschränkung (Änderung) des tRNA-Methyltransferasenspektrums (anderer Modifikationsgrad) entsprechend der bereits oben diskutierten Überlegung.

Die gleichen Ursachen können sich im Aktivitätsunterschied zwischen Königinnenenzymen und Arbeiterinnenenzymen auswirken.

Durch die Untersuchung des Reaktionsprodukts (tRNA) läßt sich feststellen, ob sich der Modifikationsgrad bei den Kasten bzw. im Laufe der Entwicklung geändert hat. Dafür bieten sich zwei Möglichkeiten an.

1. Man isoliert aus Bienen verschiedenen Alters (verschiedener Entwicklungsstufe) tRNA und läßt sie durch tRNA-Methyltransferasen anderer Entwicklungsstadien methylieren (im weiteren Verlauf dieser Arbeit als "Kreuztest" bezeichnet).
2. Man inkubiert tRNA mit Enzymen aus verschiedenen Entwicklungsstadien bzw. Kasten wie bisher, aber unter Rückgewinnung und Untersuchung der modifizierten tRNA (im weiteren Verlauf dieser Arbeit "Spezifitätstest" genannt).

Beide Möglichkeiten wurden experimentell geprüft. Nimmt man als Ursache für die Aktivitätsänderung nur eine Aktivierung der tRNA-Methyltransferasen ohne Änderung im Modifikationsgrad der entstehenden tRNA an, dann sollten auch Entwicklungsstadien mit den höchsten Enzymaktivitäten tRNA aus den anderen Entwicklungsstadien nicht methylieren, weil anzunehmen ist, daß die Enzymaktivität eines Organismus ausreicht, um den Modifikationsgrad quantitativ zu erreichen.

Nach BAGULEY u. STAEHELIN (3, 5, 1968) führen Extrakte aus verschiedenen Organen in Langzeitversuchen zu quantitativ gleich stark methylierten Nucleotiden. Demnach sind Inkubationszeit und die Menge noch nicht modifizierter tRNA die limitierenden Faktoren, welche eine bei verschiedenen Aktivitäten auftretende quantitative Modifizierung verhindern können. tRNA-Methyltransferasen der fünf jüngeren Puppenstadien (Po, Pmh, Pmd-Ph und Ph)+ könnten also tRNA aus allen anderen Entwicklungsstadien im Kreuztest methylieren. Umgekehrt sollten tRNA-Methyltransferasen aus Larven und alten Entwicklungsstadien tRNA aus den oben genannten Puppenstadien nicht methylieren können.
Bei Erhöhung der Methyltransferasenspezifität im Laufe der Entwicklung müßten, trotz schwankender Gesamtaktivität, die Methyltransferasen eines älteren Stadiums jede tRNA eines jüngeren Entwicklungsstadiums methylieren können. Dies gilt auch für den Fall, daß in den Puppenstadien keine neue tRNA synthetisiert, sondern nur vorhandene tRNA weiter modifiziert wird. Falls in den älteren Entwicklungsstadien auch eine Synthese von neuer tRNA stattfindet, müßte diese bei einer Spezifitätsänderung der Methylasen auch von tRNA-Methyltransferasen jüngerer Entwicklungsstadien methyliert werden.

3.2 Aktivität gegenüber $tRNA_{Apis}$ aus verschiedenen Entwicklungsstadien (Kreuztest)

Nach den bisherigen Veröffentlichungen sollen homologe Reaktionen, wie sie der Kreuztest darstellt, zwischen tRNA-Methyltransferasen und tRNA der gleichen Art keinen meßbaren Einbau von Methylgruppen zeigen (GOLD et al. 26, 166, 1963). Auch bei den Kreuztests von $tRNA_{Apis}$ und Apis-tRNA-Methyltransferasen lassen sich die Einbauraten nur schwer

---

+ Erklärung der Abkürzungen s. Tab. 2

statistisch absichern. Das Schwergewicht dieser Arbeit liegt auf Untersuchungen der entwicklungsabhängigen Aktivität und kastenabhängigen Spezifität der tRNA-Methyltransferasen. Ein Vorversuch sollte deshalb nur klären, ob bei dem untersuchten biologischen Modell der entwicklungsbedingte Altersunterschied im Kreuztest einen Methyleinbau ermöglicht, und ob zwischen den in Kapitel 3.1 abgeleiteten Möglichkeiten bezüglich der tRNA-Methylierung eine Entscheidung getroffen werden kann. Einbauraten der homologen Reaktion im Bereich von weniger als 80 Ipm/mg Protein (vgl. Tab. 2) sollen deshalb nur als Tendenzen gedeutet werden, während die über 100 Ipm/mg liegenden Einbauraten als signifikant gelten können. Diese Einbauraten treten allerdings nur bei hoch aktiven tRNA-Methyltransferasen aus einigen jungen Puppenstadien gegenüber tRNA aus dem jüngsten Puppenstadium auf und lassen deshalb die Möglichkeit einer nicht quantitativen Modifizierung und einer Änderung der Methyltransferasenspezifität offen.

Die Methylierung der Po-tRNA durch Pmd-tRNA-Methyltransferasen wäre nach Abb. 7 allein durch die höhere Aktivität erklärbar. Nimmt man aber an, daß in der Puppe genügend Zeit zur Methylierung zur Verfügung steht, müßte man in diesem Falle eine Änderung der Spezifität in der älteren Puppe gegenüber der jüngeren annehmen. Der Einbau in $tRNA_{APo}$ durch KPmd- und KPh-Enzyme ist nur durch Spezifitätsänderung der tRNA-Methyltransferasen erklärbar. Warum in $tRNA_{KPmd-KPh}$ kein Methyleinbau erfolgte, konnte nicht geklärt werden. U.U. könnte eine Inhibitorwirkung (LITTAUER et al. 41, 502, 1966; KERR 37, 690ff, 1970) diskutiert werden.

Enzym von	RNA aus Apis (verschiedene Entwicklungsstadien bzw. Kasten) Arbeiterin										Königin	E.coli		Hefe
	Le	N	Po	Pmh	Pmd	Pmd-Ph	Ph	Pbh	Pbd	Ba	Pbd	normal	Methyl-mangel	
Arbeiterin:														
Lc-Ld	0	0										141	110	11
Le	0	0									2		83	
N	0	0									6		118	
Po			0						0		0		172	
Pmh				6	3				8	8	8	223	200	
Pmd		3	112	13	4		0	0	0	0	13	308	250	
Pmd-Ph		0	48		0	0	0		0		10	235	192	
Ph	0	13			0		0	0	0	0	2		201	
Pbh								0			2		137	
Pbd		14	0	12		0			0	4	0	175	156	
Ba		14								0	0		63	
Königin:														
Lc-Ld	0	0										117	97	i
Le	0	0									0		45	
N	0	0									4		102	
Po											3		102	
Pmh											11		122	
Pmd		0	133						0	0	22		155	
Pmd-Ph		3	6								15		165	
Ph		5	107		0				4	0	0		133	
Pbh													114	
Pbd	15	7	0	18	0	0	0	2	0	4	2		112	
Ba													118	

Tab. 3: Methylierungsraten im Aktivitäts- und Kreuztest. Einbaurate in Ipm/mg Protein; Abkürzungen wie in Tab. 2. In der oberen waagrechten Spalte sind die Quellen der verschiedenen tRNAs, in der linken senkrechten Spalte die Quellen der verwendeten Enzyme angegeben. Die den leeren Feldern entsprechenden Kombinationen wurden nicht getestet.

4. Untersuchungen zum Spezifitätsunterschied zwischen Königinnen- und Arbeiterinnen-tRNA-Methyltransferasen aus dem gleichen Entwicklungsstadium

In getrennten Inkubationen übertrugen Enzyme aus sich gerade anfärbenden Puppen (Pmd-Ph) der Arbeiterin ^{14}C-Methylgruppen, Enzyme der Königin aus dem gleichen Entwicklungsstadium ^{3}H-Methylgruppen auf Methylmangel-$tRNA_{E.\ coli}$. Die Inkubationsansätze wurden abgekühlt, vereinigt und auf einer DEAE-Cellulosesäule getrennt.

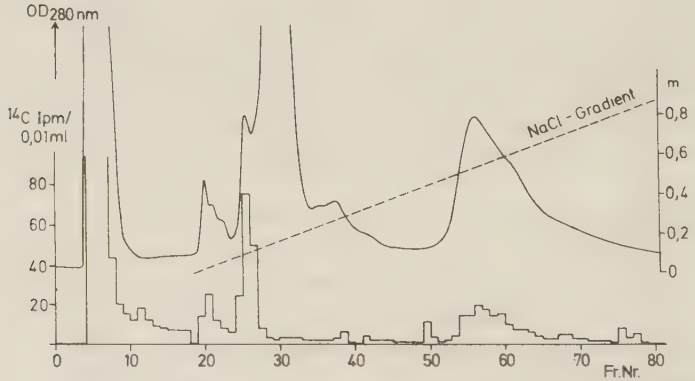


Abb. 8: Elutionsdiagramm einer DEAE-Cellulosesäule (30 x 1,8 cm). Es wurden die vereinigten Inkubationsgemische von Königin- und Arbeiterin-tRNA-Methyltransferasen (Pmd-Ph) mit Methylmangel-$tRNA_{E.\ coli}$ aufgetragen. Gradient von 0,0 m bis 1,0 m NaCl in m/100 Tris-HCl, pH 7,5; Fraktionsgröße 11 ml. Radioaktivität im Feststoffzähler (TRACERLAB) gezählt, ohne Selbstabsorptionskorrektur.

Bei Elution mit Tris-Puffer verläßt zuerst der Veronal-Acetat-Puffer zusammen mit nicht umgesetztem SAM die Säule (Abb. 8). Die meiste Radioaktivität befindet sich in die-

ser Fraktion. Bis zu einem Gehalt von 0,4 m NaCl werden Proteine eluiert; die Fraktionen 26 und 27 waren besonders stark radioaktiv; dieser Protein-Vorgipfel wurde aber nicht weiter untersucht. Er fehlt signifikant im nicht inkubierten, SAM-freien Inkubationsgemisch mit Pmd-Enzym (vgl. Abb. 9) und könnte einen Protein-SAM-Komplex, Protein-SAM-RNA-Komplex, RNA-Methylprotein-Komplex, Methyl-RNA-Protein-Komplex oder methyliertes Protein enthalten. Im Bereich zwischen 0,4 und 0,8 m NaCl sind die Nucleinsäuren einschließlich der unmarkierten $tRNA_{Apis}$ enthalten (Fraktionen 51 bis 78).

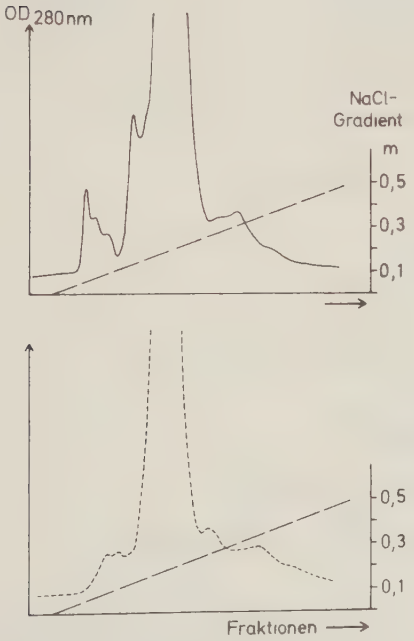


Abb. 9:

Vergleich der Elutionsdiagramme eines Inkubationsgemisches vor und nach der Inkubation.

——— Ausschnitt aus Abb. 8

---- nicht inkubiertes Gemisch aus Mangelmethyl-$tRNA_{E. coli}$ und Pmd-Enzym ohne SAM, im Inkubationspuffer aufgetragen.

Nach Rückgewinnung der gereinigten Nucleinsäure verlief die weitere Aufarbeitung in Anlehnung an RAJ-BHANDHARY et al.

(57, 565ff, 1968), teils auch an TAKEMURA et al. (72, 827ff, 1968). Nach Spaltung mit T_1-RNase wurden die Oligonucleotide auf einer Harnstoffsäule aufgetrennt. Von diesen Fraktionen wurde die Radioaktivität und die optische Dichte gemessen (vgl. Abb. 10).

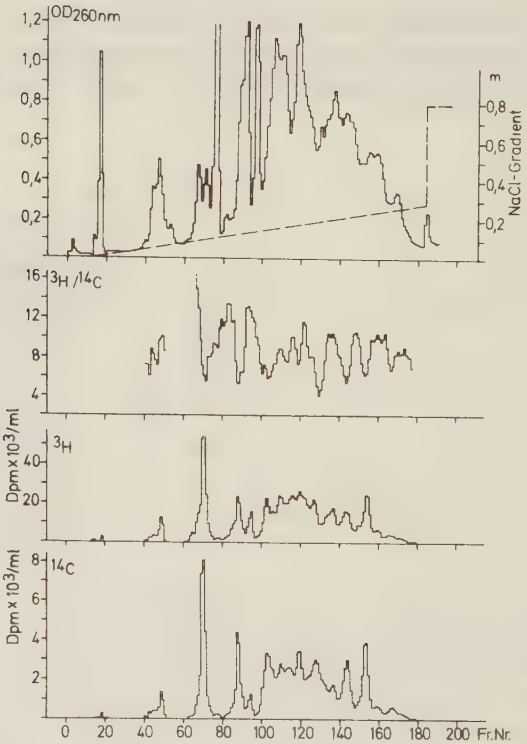


Abb. 10: Auftrennung der Oligonucleotide nach T_1-RNase-Spaltung auf einer DEAE-Cellulosesäule (100 x 1 cm) in m/100 Tris-HCl, pH 7,5, mit 7 m Harnstoff und einem Gradienten von 0,0 m bis 0,3 m NaCl. ^3H-Radioaktivität wurde von Königinnen-tRNA-Methyltransferasen, ^{14}C-Radioaktivität von Arbeiterinnen-tRNA-Methyltransferasen in $tRNA_{E.\ coli}$ eingebaut. Diskriminierende Messung der Radioaktivität im Flüssigkeits-Scintillationszähler (PACKARD 3380). Zweites Teildiagramm: Verhältnis der Radioaktivität der Isotope ^3H und ^{14}C im Verlauf der Chromatographie.

Der erst der 5 Gipfel der Chromatographie konnte auf Grund von UV-Spektren als G>p [+] identifiziert werden. Die noch vorhandene Menge G>p ist ein Maß für den Grad der erfolgten T_1-RNase-Spaltung, die hier nicht ganz quantitativ erfolgt war.
Sofern nicht Verschiebungen durch positiv geladene oder Cyclophosphat enthaltende Nucleotide erfolgen, werden die RNA-Bruchstücke größerer Länge erst später eluiert.

Der Einbau der tritiierten und ^{14}C-markierten Methylgruppen mit Ausnahme der Fraktionen 62 bis 64 erfolgt in die gleichen UV-absorbierenden Gipfel. Es ist kein Gipfel dabei, der nur ^{3}H oder nur ^{14}C enthält. Da aber in einer Fraktion mehrere Oligonucleotide enthalten sein können, ist dieses Verfahren noch nicht schlüssig genug. Das Verhältnis der beiden radioaktiven Isotope zueinander weicht nämlich über die Chromatographie hinweg stark vom Mittelwert 8,02 ab (vgl. Abb. 10).

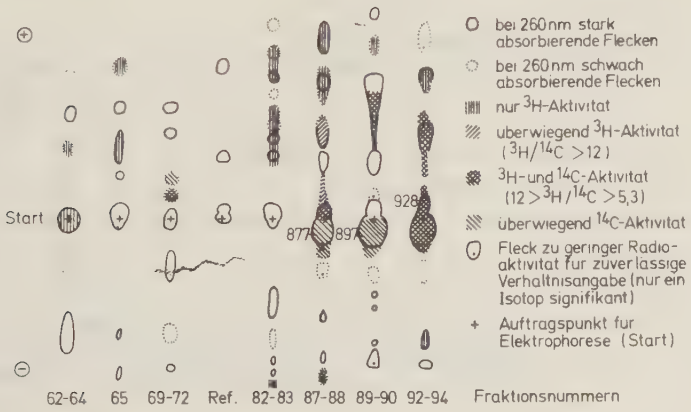


Abb. 11: Verhalten einiger gereinigter Fraktionen aus der Chromatographie auf der Harnstoffsäule in der Hochspannungspapierelektrophorese.
Die absolute Laufstrecke der Referenzen war bei den drei Elektrophoresen nicht ganz gleich und ist deshalb für die Abbildung auf gleiche Werte korrigiert. Der dreifache Dpm-Nullwert wurde als signifikante Aktivität angesehen.

+ G>p = Guanosincyclophosphat

Einige Fraktionen mit extremen Radioaktivitätsverhältnissen wurden deshalb entsalzt und die Oligonucleotide nach Phosphomonoesterasespaltung in einer Hochspannungspapierelektrophorese aufgetrennt (vgl. Abb. 11).

Da relativ viele Flecken in Richtung Kathode wanderten, ist anzunehmen, daß sich ein Teil der Oligonucleotide während der Weiterbehandlung unspezifisch gespalten hat (DÜTTIG u. ZACHAU 21, 575, 1964). Dabei besteht die Möglichkeit, daß einige Spaltprodukte mit ungespaltenen Oligonucleotiden gleichen RUp-Wertes gemeinsam im elektrischen Feld wandern und sich bei der Auszählung der Radioaktivität eine Verhältnisverschiebung zu ungunsten einer Isotopenauftrennung ergibt.
Die Radioaktivität verteilt sich wie folgt:

	Fleckenzahl	
nur ^{3}H-Radioaktivität	11	
nur ^{14}C-Radioaktivität	0	
bevorzugt ^{3}H-Radioaktivität	2	
bevorzugt ^{14}C-Radioaktivität	3	
^{3}H- und ^{14}C-Radioaktivität	7	(etwa Durchschnittsverh $^{3}H/^{14}C$
zu geringe ^{14}C-Aktivität für zuverlässige Verhältnisangabe	6	
nicht radioaktiv (bei 260 mμ absorbierend)	36	
Gesamtzahl	65	

Tabelle 4: Isotopenverteilung nach Elektrophorese einiger Fraktionen aus der Harnstoffsäule. ^{3}H-Markierung geht auf Königinnenenzyme, ^{14}C-Markierung auf Arbeiterinnenenzyme zurück.

Nucleotide, die nur Tritiumaktivität enthalten, wurden ausschließlich von Königinnenenzymen methyliert. Für sie sind KPmd-Ph-tRNA-Methyltransferasen spezifisch.

Für Nucleotide, die bedeutend mehr Tritiumaktivität als ^{14}C-Aktivität (im Vergleich zum Durchschnittsverhältnis) besitzen, ist entweder eines der beiden kastenspezifischen Enzyme aktiver oder - und das gilt vor allem für Verhältnisse von 16:1 bzw. 4:1 - das Nucleotid wird vom einen Enzym an zwei verschiedenen Stellen, vom anderen aber nur an einer Stelle methyliert. Sieben Flecken enthalten ^{3}H- und ^{14}C-Aktivität im Durchschnittsverhältnis. Sie werden also von Arbeiterinnen- und Königinnen-tRNA-Methyltransferasen gleich stark methyliert.

Nach diesen Ergebnissen methylieren die Königinnenmethyltransferasen das tRNA-Molekül an mehr Stellen, als es die Arbeiterinnenmethyltransferasen tun, allerdings meist nicht so stark wie diese. Ob letzteres an der geringeren Methylierungsaktivität der Königinnenmethyltransferasen oder an dem seltenen Auftreten solcher Stellen in der tRNA liegt, kann solange nicht entschieden werden, wie eine eindeutige Identifizierung der Flecken nicht gelungen ist.

Bei einigen Flecken wurde eine Identifizierung durch Elution und Messen der UV-Spektren versucht. Keiner der Flekken stimmt in allen 9 Kriterien (RUp-Wert, Absorptionsverhältnisse $\frac{250}{260}$, $\frac{280}{260}$, $\frac{290}{260}$ - in neutraler und saurer Lösung gemessen - und Extinktionsmaxima) mit den Angaben in der bisher bekannten Literatur überein (DÜTTIG u. ZACHAU 21, 578f, 1964; ZACHAU et al. 78, 224ff, 1966; HACKER u. MANDEL 28, 45, 1969; TRIM u. PARKER 74, 592ff, 1970). Aus gefriergetrockneten Elutionen der stärksten Flecken wurden Fingerprints auf Dünnschicht-Celluloseplatten angefertigt und, wenn nötig (siehe Abb. 12, 13 und 14), autoradiographisch ausgewertet.
Die Auswertung ist, da sie aus Materialmangel nur in zwei Systemen getestet wurde, nicht eindeutig, vor allem, da es an Referenzen seltener Nucleoside und entsprechenden Angaben in der Literatur fehlt.

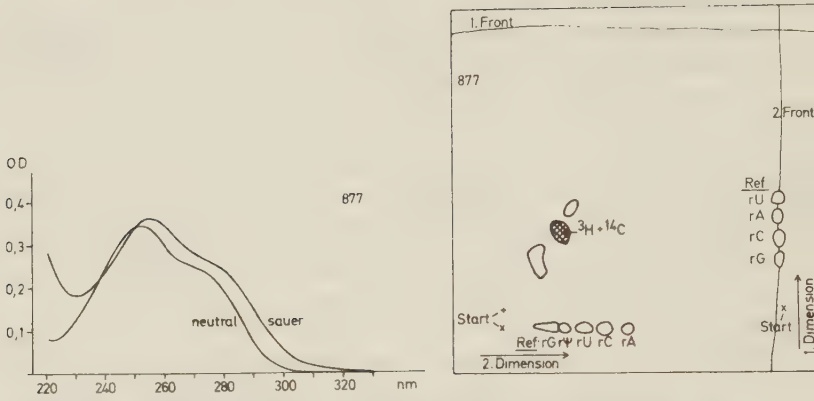
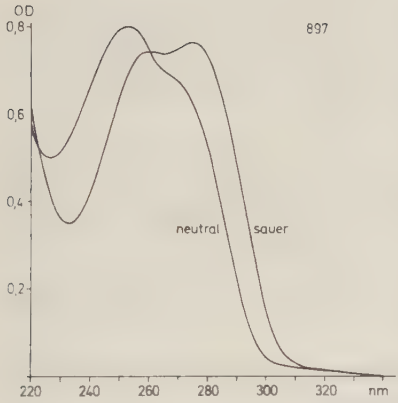
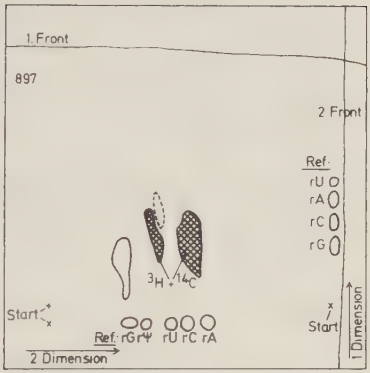


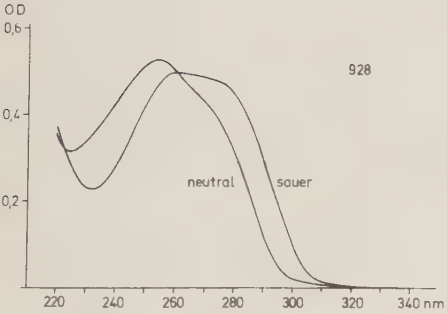
Abb. 12: UV-Spektrum des Elektrophoreseflecks 877, pH 2 und pH 7. Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie des gleichen Flecks nach Phosphoesteraesespaltung.

Das Spektrum mit der Basenfolge von UpCpG liegt dem gemessenen Spektrum von Fleck 877 am nächsten. In der Dünnschichtchromatographie lassen sich drei verschiedene Flekken, rG und rU sowie ein methylierter Fleck, nachweisen. Konsequenterweise muß dieser, auch wenn er gegenüber der von HACKER und MANDEL (28, 45, 1969) im System der 2. Dimension angegebenen Laufstrecke des 5-Methylcytosin für Papierchromatographie etwas zurückbleibt, Methylcytosin sein.

Das Spektrum des Flecks 897 kommt mit seinen Kriterien der Basenfolge CpG bzw. 5mCpG nahe. Er enthält aber, wie die Elutionsstelle (Fraktionsnummer) der Harnstoffsäule bereits vermuten läßt und, wie auch die Dünnschichtchromatographie zeigt, außer 5-Methylcytosin noch ein weiteres methyliertes Nucleosid, das nicht identifiziert werden konnte, möglicherweise Methylcytosin.







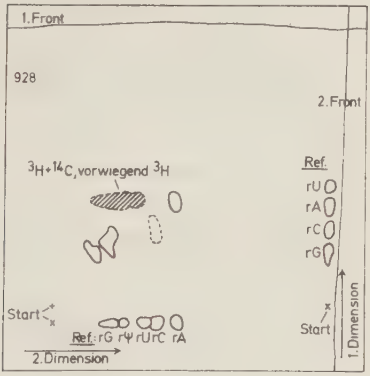


Abb. 13 - 14: UV-Spektren der Elektrophoreseflecken 897, 928, pH 2 und pH 7, Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der gleichen Flekken nach Phosphoesterasespaltung.

Schließlich läßt das Spektrum 928 auf eine Basenzusammensetzung aus G, C und U oder A schließen. Durch die Dünnschichtchromatographie wird zugunsten von G und A entschieden. Infolge der etwas veränderten Laufstrecke und der Radioaktivität von rC ergibt sich der Verdacht auf eine anders gebundene Methylgruppe im Methylcytosin als in den Flecken 877 und 879.

Nach den bisherigen Ergebnissen enthalten die drei weiter untersuchten Elektrophoreseflecken also folgende Nucleotide:

Nr. 877 Guanosinphosphat, Uridinphosphat und Methyl-Cytosinphosphat,

Nr. 897 Guanosinphosphat, Methyl-Cytosinphosphat und ein weiteres seltenes Nucleotid,

Nr. 928 Guanosinphosphat, Methyl-Cytosinphosphat und Adenosinphosphat,

wobei das Cytosin teilweise bevorzugt von Königinnenenzymen methyliert wurde.
Eine Aussage über die Art des Unterschiedes in der Spezifität ist erst mit Hilfe von mehr Material und einer verbesserten Methode möglich.

5. Diskussion

Mit den Untersuchungen von OSANAI u. REMBOLD (51 (1968)) bzw. CZOPPELT u. REMBOLD (19 (1970)) wurden tiefgreifende Unterschiede im Stoffwechsel und durch LIU u. DIXON (42, 875ff, 1965) auch im Proteinmuster beider Kasten der Honigbiene nachgewiesen. In dieser Arbeit sollte nun geprüft werden, ob eine unterschiedliche Methyltransferasenaktivität oder -spezifität in den Kasten vorhanden ist, was einen Einfluß des Determinationsstoffs oder seiner Metabolite auf die Modifizierung der tRNA beweisen würde. Solche kastenspezifische Unterschiede wurden in der Tat gefunden.

Wie schon von verschiedenen Organismen bekannt ist (vgl. S. 3), ist die tRNA-Methyltransferasenaktivität beeinflußbar und entwicklungsabhängig verschieden (vgl. S. 5). Letzteres wurde in dieser Arbeit auch für die beiden Kasten von Apis mellifica bestätigt. Das Aktivitätsmaximum liegt in einem Entwicklungszeitpunkt der Puppenruhe, in welchem die Aktivität der Stoffwechselenzyme ihr Minimum erreicht (vgl. Abb. 7 u. Lit. 19 u. 51).
Kastenspezifische Unterschiede in der tRNA-Methyltransferasenaktivität sind vorhanden, aber nur in ihrem Aktivitätsmaximum (kurz vor Beginn der Melanisierung) signifikant. Die spezifische Methyltransferasenaktivität liegt im allgemeinen bei der Arbeiterin höher als bei der Königin, wobei der Gesamtproteingehalt einer Königin allerdings in jedem Entwicklungsstadium fast doppelt so hoch ist wie der einer Arbeiterin. Über die spezifische Aktivität bestimmter Transferasen wird in dieser Arbeit keine Aussage gemacht, da die Enzyme nicht isoliert und gereinigt wurden.

Die verwendete Arbeitsmethode liefert Hinweise dafür, daß bei hoher Phenoloxydaseaktivität, die in einigen Fällen in Enzymextrakten aus älteren Entwicklungsstadien (Pbd, Ba) auftrat (Schwärzung der Testlösung während der Inkubation),

die Methyltransferasenaktivität stark ansteigt. So kam es z. B. bereits in Blindwertinkubationen des Stadiums Pbd (ohne $tRNA_{E.\ coli}$) zu einer gegenüber dem normalen Blindwert zusätzlichen Methyleinbaurate von 70 Ipm/mg Protein. Ob es sich hierbei um Proteinmethylierung (MURRAY 49, 11ff, 1964; PAIK u. KIM 53, 1209ff, 1968; LISS et al. 40, 1648ff, 1969) oder um Methylierung der arteigenen tRNA handelt, wurde nicht untersucht. Während der Inkubation gedunkelte Lösungen wurden deshalb nicht in die Auswertung einbezogen. Es wurde für alle Entwicklungsstadien das gleiche Inkubationsgemisch verwendet, obwohl die tRNA-Methyltransferasen jedes einzelnen Stadiums andere optimale Bedingungen haben könnten, wie es z.B. für verschiedene Organe eines Organismus nachgewiesen wurde (KAYE u. LEBOY 36, 297, 1968). Man kann diskutieren, daß die Aktivitätskurve der tRNA-Methyltransferasen bei gleicher Gesamtaktivität aller Entwicklungsstadien nur ein verschieden gutes Angepaßtsein an die vorgegebenen Inkubationsbedingungen widerspiegelt. Dieser Einwand ist allerdings nur bei einer verschiedenen Spezifität der Methyltransferasen zutreffend. Es ist aber sehr unwahrscheinlich, daß ein bestimmtes tRNA-Methyltransferasenenzym unter den gleichen Bedingungen und bei gleicher Aktivität im einen Entwicklungsstadium eine andere Kinetik zeigt, als in einem anderen.
Daß im gleichen Entwicklungsstadium zwischen beiden Kasten Spezifitätsunterschiede der tRNA-Methyltransferasen auftreten, wurde in dieser Arbeit durch das Rückgewinnen ausschließlich tritiierter Nucleotide bewiesen.

Dieser Befund schließt allerdings nicht aus, daß bestimmte Enzyme mit gleicher Funktion in beiden Kasten nach der Aufarbeitung unterschiedlich funktionsfähig sind. Es könnte beispielsweise ein Enzym bei der einen Kaste weniger beständig sein als bei der anderen. Auch könnten Enzyme, die auf die Methyltransferasen einwirken (z.B. Methyltransferaseninhibitoren, KERR 37, 690ff, 1970), trotz gleicher Aufarbeitung

verschieden beeinflußt werden, wenn sie nicht in allen Eigenschaften in beiden Kasten gleich sind. In beiden Fällen aber hätten die Proteine unterschiedliche Eigenschaften, wären also kastenspezifisch verschieden.

Nach Chromatographie auf einer Harnstoffsäule wurde bei der weiteren Reinigung der Spaltprodukte eine unkontrolliert abgelaufene Spaltung von Phosphatbindungen festgestellt. Isotopeneffekte können aber weder auf die Hydrolyse, noch auf das Isotopenverhältnis dieser Spaltprodukte, noch auf die Wanderungsstrecke der verschieden markierten Nucleotide einen merklichen Einfluß nehmen, da im Molekulargewicht nur eine Differenz von etwa 1% auftritt.

Die Erhöhung der Methyleinbauraten in Anwesenheit von Phenoloxydase macht zusätzlich einen Zusammenhang zwischen Methylierung und Melanisierungsprozeß wahrscheinlich. Der Aktivitätsvergleich der Bienen-tRNA-Methyltransferasen bezieht sich auf die artfremde $tRNA_{E.\ coli}$. Es gibt also nur dann einen Einbau von Methylgruppen, wenn eine Nucleotidsequenz der zu methylierenden tRNA (wie sie z.B. BAGULEY et al. (5, 1645, 1970) für die Methylierung von ApmApUp gefunden haben) mit der arteigenen, kasteneigenen bzw. entwicklungsstadiumseigenen übereinstimmt. Dabei ist stillschweigend vorausgesetzt, daß in einem Organismus nicht auch noch Methyltransferasen für ältere Entwicklungsstadien "auf Vorrat" gemacht werden. Für in Bienen zwar vorhandene tRNA-Methyltransferasen, denen aber in der $tRNA_{E.\ coli}$ keine methylierbare Sequenz entspricht, ist kein Methyleinbau zu erwarten. Die tatsächliche Aktivität der tRNA-Methyltransferasen der Biene wird also sicher in allen Fällen größer sein, als die gegenüber E. coli gemessene. Infolge dieser Selektivität der $tRNA_{E.\ coli}$ liefern die Ergebnisse des Inkubationstests die günstigste Adaptation an die-

ses E. coli-System für die Kasten und ihre Entwicklungsstadien. Da in der Aktivität Unterschiede auftreten, sind die tRNA-Methyltransferasen in den Kasten und ihren Entwicklungsstadien nicht vollkommen identisch. Es ist unwahrscheinlich, daß diese Unterschiede allein auf Inhibitorenwirkung (BAGULEY u. STAEHELIN 3, 6, 1968) zurückzuführen sind. Da im Falle der quantitativen Methylierung von Leber-$tRNA_{Ratte}$ mit Methyltransferasen aus Rattenleber und leukämischer Rattenmilz (BAGULEY u. STAEHELIN, 3, 5f, 1968) eine Nivellierung des Methyleinbaus gegenüber $tRNA_{E.\ coli}$ eintrat, bleibt zunächst die Frage offen, ob sich im Falle dieser Arbeit die "fertig" modifizierten tRNAs der einzelnen Kasten und Entwicklungsstadien de facto in ihrem Methylierungsgrad unterscheiden. Es ist auch noch nicht geklärt, ob die tRNA in vivo überhaupt an allen Stellen quantitativ methyliert wird. Aktivitätstests lassen deshalb generell über den Methylierungszustand der tRNA in vivo keine zuverlässige Aussage zu. Die in vitro Aktivität innerhalb der Inkubationszeit gegenüber $tRNA_{E.\ coli}$ schwankt aber bei der Honigbiene in beiden Kasten entwicklungsabhängig und läßt die Vermutung zu, daß im Organismus, trotz der zur Verfügung stehenden Zeit, nicht quantitativ methyliert wird.

Die tRNA-Methyltransferasen sind basenspezifisch (33, 3462ff, 1964). Sie methylieren nicht jede Base, sondern nur Nucleotide in bestimmter Nachbarschaft zu anderen Nucleotiden (BAGULEY u. STAEHELIN 4, 260, 1969 u. 2, 45ff, 1968). Je weniger Basen in die Erkennungsregion des zu methylierenden Nucleotids einbezogen werden (unspezifischere Methylierung), desto mehr methylierbare Stellen finden sich für eine tRNA-Methyltransferase auf einer zur Methylierung zur Verfügung gestellten tRNA.
Wie in dieser Arbeit gezeigt, methylieren die KPmd-KPh-Königinnenenzyme die $tRNA_{E.\ coli}$ an bedeutend mehr Stellen, als

die Enzyme des entsprechenden Arbeiterinnenstadiums. Die unspezifischere Methylierung könnte also bei den Königinnenenzymen im Vergleich zu den Arbeiterinnenenzymen auftreten. Da aber die beiden genetisch homologen Kasten sicher sehr verwandte, ja zum Großteil identische Enzyme enthalten müssen, ist eine wesentliche Ausweitung der Methyltransferasenerkennungsregion für die Test-tRNA bei der Arbeiterin im Vergleich zur Königin fast mit Sicherheit auszuschließen.

Eine Erweiterung des Spektrums der Methyltransferasentypen würde ebenfalls mehr Stellen der Test-tRNA für methylierende Enzyme zugänglich machen. Es ist wahrscheinlich, daß sich im Falle der Königin mehr spezifische Stellen in der E. coli-tRNA zur Methylierung anbieten, als einem kleineren Spektrum im Falle der Arbeiterinnen.
Dafür spricht auch das Aktivitätsverhältnis: Hochspezifische Stellen (gleichsam "ökologische Nischen" für die Apis-tRNA-Methyltransferasen) werden in der $tRNA_{E.\ coli}$ sehr selten sein und deshalb trotz tRNA-Überschuß im Test nicht als große Enzymaktivität in Erscheinung treten. Dagegen müßten "normale" - relativ häufig in den tRNAs auftretende - Methylierungsstellen auch als höhere Enzymaktivität feststellbar sein.
Es spricht also vieles dafür, daß die Königinnen im Entwicklungsstadium KPmd-KPh eine größere Vielfalt von spezifischen tRNA-Methyltransferasen besitzen, als die Arbeiterinnenkaste dieses Entwicklungsstadiums. Wegen der erniedrigten Einbaurate bei Königinnenenzymen muß die Aktivität oder die Anzahl der verschiedenen Enzyme, die bei der Arbeiterin vorkommen, bei der Königin eingeschränkt sein. Der differenziertere Modifikationsgrad der verschiedenen tRNAs der Königin würde u.U. ausreichen, die Proteinbiosynthese eines jeden Entwicklungsstadiums anders zu regulieren, als dies bei der Arbeiterin der Fall ist. So könnte z. B. bei der Königin der Tyrosingehalt im Protein frü-

her gesteigert werden, als bei der Arbeiterin und dadurch die Melanisierung beschleunigt werden. Eine Regulationsmöglichkeit wäre in dem Moment gegeben, wenn die Modifikation einer bestimmten tRNA zu einem Erkennen (oder nicht-mehr-Erkennen) seltener Triplets auf der mRNA+ führt und dadurch die Polypeptidkette bei der Proteinbiosynthese verlängert (oder verkürzt) wird (analog einer Annahme von ILAN et al. 35, 1280, 1970). Folglich könnte man annehmen, daß durch den Einfluß des Determinationsstoffs oder seiner Metabolite ausschließlich oder in anderer zeitlicher Reihenfolge ein vollständiges Entfalten des tRNA-Methyltransferasenspektrums und die morphogenetische Ausdifferenzierung zum vollentwickelten Geschlechtstier gewährleistet wird.

+ mRNA = messenger ribonucleic acid

6. Zusammenfassung

Die tRNA-Methyltransferasenaktivität der Honigbiene wurde in einem in vitro System getestet. Die Eigenschaften dieser Enzymextrakte wurden für die Summe aller Entwicklungsstadien charakterisiert.
Die Entwicklungsabhängigkeit der tRNA-Methyltransferasenaktivität von Arbeiterinnen und Königinnen wurde in vitro mit Methylmangel-$tRNA_{E.\ coli}$ als Substrat bestimmt. Die spezifische Aktivität hat kurz vor der beginnenden Melanisierung der Puppen ihr Maximum und ist bei der Arbeiterin durchweg höher als bei der Königin, unterscheidet sich aber nur im Maximum signifikant. Der Einbau von Methylgruppen in Normal-$tRNA_{E.\ coli}$ erfolgt in der gleichen Größenordnung, wurde aber nur für Bienenenzyme aus wenigen Entwicklungsstadien getestet. Der Einbau in Hefe-tRNA ist bedeutend geringer. In einigen Kreuztests wurde versucht, tRNA aus einem Entwicklungsstadium mit Transferasen aus anderen Entwicklungsstadien der Honigbiene zu methylieren. Dies gelang nur im Falle von Enzymen aus APmd, KPmd und KPh gegenüber $tRNA_{APo}$. Phenoloxydaseaktivität erhöht den Einbau wesentlich.

Für ein Stadium (Pmd-Ph) wurde die tRNA-Methyltransferasenspezifität beider Kasten durch Einsetzen verschiedener radioaktiver Isotope (^{3}H und ^{14}C) untersucht. Die Nucleinsäuren wurden nach getrennter Inkubation zurückgewonnen und gemeinsam stufenweise enzymatisch - in einigen Fällen bis zu einzelnen Nucleosiden - gespalten.

Die Königinnenenzyme methylieren $tRNA_{E.\ coli}$ an mehr Stellen, als die tRNA-Methyltransferasen der Arbeiterinnen. In einigen Oligonucleotiden wurde nur ^{3}H-Aktivität gefunden. In den anderen radioaktiven Flecken waren stets Enzyme beider Kasten an der Methylierung beteiligt, in einigen Fällen

die Enzyme der einen Kaste doppelt so stark wie die der anderen und umgekehrt. Die spezifischen Enzyme der Königin weisen offensichtlich ein breiteres Spektrum von tRNA-Methyltransferasen auf als die der Arbeiterin. Eine mögliche Auswirkung dieses Spezifitätsunterschiedes auf die Regulation der Proteinbiosynthese wird diskutiert.

7. Experimenteller Teil

7.1 Züchtung der Bakterien

E. coli $K_{12}met^{-}RC^{rel}$ wurde bis gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase, unter Verzicht auf Glycerin, auf Vollmedium nach FRASER (25, 294, 1953) in Fernbachflaschen bei 37°C unter Schütteln (BOREK et al. 14, 461, 1955; VOGEL u. BRONNER 76, 98, 1956) 12 Stunden lang bebrütet und anschließend nach kurzem Waschen 4 Stunden lang, in Anlehnung an FLEISSNER u. BOREK (24, 1201, 1962), auf Mangelmedium M9 (KLEIN, mündl. Mitteilung) gesetzt:

M9-Medium: pro Liter

7,46 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
3,0 g KH_2PO_4
1,0 g NH_4Cl
0,5 g NaCl
0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
5,0 g Glucose
1,0 ml m/1000 $FeCl_3$-Lösung
1,0 ml 0,1 m $CaCl_2$-Lösung
3,0 mg L-Methionin
(nach HURWITZ 33, 3463, 1964)
(Firma MERCK, Darmstadt)

Dann wurden die Bakterien durch 20-minütiges Abzentrifugieren bei 5000 U/min (MSE-High Speed Zentrifuge, Rotor Nr. 69179) geerntet, wie von BERGMANN et al. (9, 1735, 1961) angegeben, in Salzlösung gewaschen und bei -30°C eingefroren.

7.2 Gewinnung von E. coli-tRNA

Sie erfolgte in Anlehnung an die Methode von EHRENSTEIN und LIPMAN (22, 941f, 1961):

Je 100 g Bakterienmasse wurde in 500 ml m/100 Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, aufgeschlämmt und mit 500 ml gesättigter, 0,08% 8-Oxychinolin enthaltender Phenollösung 30 Minuten lang im Wasserbad bei 40°C verrührt. Nach 10 Minuten Zentrifugation in der Stock-Zentrifuge bei 3000 U/min wurde die wässrige Phase abgetrennt und die Phenolphase nochmals mit 500 ml Tris-HCl-Puffer weitere 20 Minuten lang auf dem Wasserbad gerührt und erneut zentrifugiert.

Die beiden wässrigen Phasen wurden vereinigt und ergaben 900 ml wässriger Lösung. Sie wurde mit 100 ml einer 20%-igen Kaliumacetatlösung versetzt und auf 0°C vorgekühlt. Durch Zusetzen von zwei Liter vorgekühltem Äthanol wurde die RNA bei -20°C ausgefällt. Nach einigen Stunden Nachkühlen wurde sie in der Stock-Zentrifuge 10 Minuten lang abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 67% Äthanol gewaschen und zweimal in 1 m Kochsalzlösung aufgenommen. Die dafür notwendigen Zentrifugationen erfolgten je 10 Minuten lang in der Stock-Zentrifuge. Der Überstand wurde 30 Std. lang bei dreimaligem Wechsel gegen dest. H_2O dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. 650 g Bakterienmasse ergaben 4 g tRNA.

Die nur auf Vollmedium gezogenen Bakterien, die normal methylierte tRNA enthalten, wurden auf die gleiche Weise aufgearbeitet.

Um diese tRNA-Präparationen aus E. coli quantitativ in Lösung zu bringen, wurde das lyophilisierte Material mit m/100 EDTA versetzt (analog CANTONI u. RICHARDS 15, 627, 1966), durch Dialyse gegen 30% Polyäthylenglycol eingeengt und nochmals gegen Tris-Puffer dialysiert.
Es wurden keine Polysaccharide (Begründung siehe Kap. 7.5) und keine Aminosäuren (wie etwa bei ZUBAY 77, 457, 1966) von der tRNA abgetrennt, da nach HANCOOK (29, 646, 1967) beladene und unbeladene tRNA-Moleküle gleiche Methylierung zeigen.

7.3 Eigenschaften der E. coli-tRNA

Proteingehalt (nach LOWRY et al. bestimmt 43, 265ff, 1951): 4% bzw. 1,4%;
DNA-Gehalt (mit Diphenylamin bestimmt 75, 299, 1956): unter der Nachweisgrenze;
RNA-Gehalt (mit Orcin bestimmt 75, 298, 1956): 65% bzw. 50%
Absorbtionskoeffizient 280 nm/260 nm (analog 8, 81, 1958): 0,50 bzw. 0,51.

Beide tRNA-Präparationen wurden im Methylierungstest mit E. coli-Enzymen getestet.
Je 1 mg RNA wurde im Inkubationssystem von QASBA (unveröffentlicht) mit 0,2 ml einer E. coli Enzympräparation (TRAUB u. ZILLIG 73, 249, 1966) und 40000 Ipm S-Adenosyl-L-Methionin 30 Minuten lang in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml bei 37°C inkubiert. Im TCA-Äthanol-fällbaren Material wurden bei Inkubation mit Mangelmethyl-tRNA 2200 Ipm und mit Normal-tRNA 506 Ipm eingebaut. Da hier keine Blindwerte (ohne Enzym bzw. ohne tRNA) gemacht wurden, sind beide Werte um etwa den gleichen Betrag zu hoch. Trotzdem erkennt man eindeutig, daß die tRNA-Präparationen den Erwartungen entsprechen.

7.4 Tiermaterial

Die Bienenarbeiterinnen wurden aus Völkern des Max-Planck-Instituts entnommen, die im Sommer in einer Loggia auf dem Dach, im Winter in einem klimatisierten Raum gehalten werden. Die Bienenköniginnen stammen von der Firma H. Mack Nachf., Illertissen, ebenso die Bienenvölker+. Arbeiterinnen und Königinnen stammen aus Völkern der Krainer Rasse.

+ Herrn Dr. K. A. Forster danke ich für seine großzügige Hilfsbereitschaft, ebenso Herrn Imkermeister H. Schlüter für die Aufzucht der Königinnenstadien.

Für die Altersbestimmung der Tiere wurde die in Tab. 2 angegebene Nomenklatur in Anlehnung an GRAF (27, 36, 1970) verwandt, die bei den Larven Größe und Lage in den Waben, bei den Puppen die Ausfärbung als Kriterien verwendet.

7.5 Gewinnung der Bienen-tRNA

Aus allen 11 Entwicklungsstadien der Arbeiterin und aus einem der Königin (KPbd) wurde auf folgende Weise $tRNA_{Apis}$ isoliert:
Je 10 g Bienenmaterial wurde in 50 ml m/100 Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, homogenisiert, bei Bedarf gemörsert und, wie bei der Gewinnung von $tRNA_{E.\ coli}$ (S. 37f), mit Phenol und Äthanol weiterbehandelt.
Nach der Dialyse der tRNA gegen H_2O wurde - ohne Gefriertrocknung - gegen 30%ige Polyäthylenglycol-m/100 Tris-HCl-Pufferlösung eingeengt und nochmals gegen m/100 Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, dialysiert. Von einer Abtrennung der Polysaccharide - etwa nach der Methode von BARLOW u. MATHIAS (7, 449f, 1966) - wurde abgesehen, weil käufliches Glycogen (MERCK, Darmstadt) im Test keine Methylierbarkeit zeigte. Der Test wird also durch Glycogen nicht beeinflußt. Andererseits kann bei der Abtrennung der Kohlenhydrate mit 2-Methoxyäthanol die tRNA gespalten werden (7, 449f, 1966).

7.6 Eigenschaften der Bienen-tRNA

RNA-Bestimmung als PO_4^{---} nach Oxydation (ALLEN 1, 861, 1940) und Farbreaktion nach HARPER (31, 788ff, 1962):

1 mg RNA entspricht $OD_{260\ nm} = 23$

Absorbtionskoeffizient 280 nm/260 nm (analog 8, 81, 1958):

0,50 bis 0,55, in Ausnahmefällen (bei ALN und APmh) 0,60 und 0,59

Proteingehalt (nach LOWRY et al. bestimmt 43, 265ff, 1951):

1% bis 4%

Glycogengehalt, nach Hydrolyse als Glucose enzymatisch nach der Methode von PFLEIDERER (55, 59ff, 1962) bestimmt:

5 bis 30 mg/ml RNA-Lösung

DNA-Gehalt (mit Diphenylamin bestimmt 75, 299, 1956):

unter der Nachweisgrenze.

7.7 Verwendete Pufferlösungen

7.7.1 Tris-HCl-Puffer

(in Anlehnung an BIRNSTIEL et al. (13, 1578, 1963))
m/100 Tris-hydroxymethyl-aminomethan
m/1000 2-Mercapto-äthanol
konz. HCl bis zum gewünschten pH

7.7.2 Veronal-Acetat-Puffer

(in Anlehnung an STEINER (70, 781, 1941))
für pH 7,6
15 ml m/7 Natriumacetat
15 ml m/7 Veronalnatrium (Diäthylbarbitursaures Natrium)
12 ml m/10 HCl
6 ml 8,5% NaCl
33 ml H_2O

7.7.3 TMA-Puffer

(in Anlehnung an TRAUB u. ZILLIG (73, 246, 1966))
0,01 m Tris-hydroxymethyl-aminomethan
0,01 m Magnesiumacetat
0,022 m NH_4Cl

0,000025 m EDTA (Äthylendiamintetraacetat)
0,05 m 2-Mercapto-äthanol
konz. HCl bis zum gewünschten pH

7.7.4 Ammonium-formiat-Puffer

(in Anlehnung an DÜTTIG u. ZACHAU (21, 574, 1964))
50 ml konz. HCOOH
10 ml m/10 EDTA (Äthylendiamintetraacetat)
in 6 l H_2O
konz. NH_3 bis zum gewünschten pH

7.8 Methyldonormischung

(Methyl-^{14}C)-S-Adenosyl-L-methionin wurde als Sulfat vom RADIOCHEMICAL CENTRE AMERSHAM mit einer spezifischen Aktivität von 34 - 52 mC/mMol geliefert. Es wurde für die Aktivitätstests (S.6ff) mit kaltem SAM von BOEHRINGER & SOEHNE, MANNHEIM auf eine spezifische Aktivität von 4,68 mC/mMol verdünnt und in TMA-Puffer (S.41f), pH 7,8, auf eine Konzentration von 288,75 mµMol/ml eingestellt.

Für die Spezifitätstests wurde das (Methyl-^{14}C)SAM unverdünnt mit einer spezifischen Aktivität von 52 mC/mMol verwendet und in TMA-Puffer (S.41f), pH 7,8, auf eine Konzentration von 866,25 mµMol/ml verdünnt.
(Methyl-^{3}H)SAM wurde vom RADIOCHEMICAL CENTRE, AMERSHAM mit einer spezifischen Aktivität von 1020 mC/mMol geliefert, mit SAM von BOEHRINGER auf 288,6 mC/mMol verdünnt und, wie oben, auf eine Konzentration von 866,25 mµMol/ml gebracht.

7.9 Präparation der tRNA-Methyltransferasen-Fraktion

Zehn bis vierzig Bienenlarven, -puppen oder Imagines wurden in 10 ml Veronal-Acetat-Puffer (S. 41) bei 0°C mit einem

Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM (BRAUN, MELSUNGEN) (56, 495, 1936) homogenisiert und bei starkem Chitingehalt zusätzlich gemörsert. Dann wurde das Material in einer BECKMAN L-2 Ultrazentrifuge bei 4°C und 105000xg 20 Min. lang zentrifugiert und der Überstand zur Abtrennung des Fetts durch Gaze gefiltert. Das Filtrat wurde sofort zum Test verwendet.

Ein Aliquot des Filtrats wurde zur Proteinbestimmung mit 2 ml 10%iger Trichloressigsäure gefällt, zentrifugiert (30' CHRIST, 3000 U/min), in 10 ml n/10 NaOH aufgelöst und nach LOWRY (42, 265ff) bestimmt.

7.10 Durchführung der Methylierungstests

0,25 ml der Enzymfraktion (siehe S.42f)
0,05 ml der tRNA-Lösung (siehe S. 38)
0,04 ml der Methyldonormischung (siehe S. 42)

wurden im Eisbad vereinigt und anschließend 80 Minuten bei 37°C im Flüssigkeitsinkubator unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,34 ml 10%iger Trichloressigsäure gestoppt und der Niederschlag aus 2,7 ml vorgekühlter 5%iger Trichloressigsäure bei 0°C abzentrifugiert (10' CHRIST, 4500 U/min). Anschließend wurde der Niederschlag zweimal mit 2,5 ml kalter 5%iger Trichloressigsäure und zweimal mit 95%igem Äthanol gewaschen und schließlich ätherget rocknet.

Der Rückstand wurde mit 0,2 ml konz. Ameisensäure versetzt und durch zehnminütiges Erhitzen im siedenden Wasserbad gelöst. Die Lösung wurde quantitativ auf Aluminiumplättchen aufgetragen, vorsichtig getrocknet und in einem Omni-Guard, Low level background counting system (TRACERLAB) gezählt.

7.11 Berechnung des Einbaus

Zu jedem Test wurden Blindwerte gemessen, und zwar Inkubationen ohne Enzym bzw. ohne SAM, wobei jeweils das fehlende Volumen durch den entsprechenden Puffer ersetzt war. Nach Selbstabsorptionskorrektur (Tab. 5, nächste Seite) wurde die Summe dieser Werte vom erhaltenen Wert des Aktivitätseinbaus abgezogen, z. B.:

Inkubation mit tRNA und Enzym nach Selbstabsorptionskorrektur 500 Ipm
Inkubation mit tRNA (ohne Enzym) nach Selbstabsorptionskorrektur 30 Ipm
Inkubation mit Enzym (ohne tRNA) nach Selbstabsorptionskorrektur 90 Ipm

ergibt einen reinen Aktivitätseinbau von 380 Ipm.

Wurden in den Ansatz 3,8 mg eingesetzt, so ergibt das einen Einbau von 100 Ipm/mg Protein, oder an Hand der spezifischen Aktivität umgerechnet 28,9 µµMol Methyleinbau in die tRNA/mg Protein.
Je nach vorhandenem Material wurden pro Stadium drei bis zehn Tests durchgeführt.

7.12 Radioaktivitätszählung im Flüssigkeitszähler

Die Zählung erfolgte im Scintillationszähler (PACKARD, Modell 3380) mit AA-Analyser. Als einzige Scintillationsmischung eignete sich "Diluene 60" (von PACKARD, FRANKFURT) für die Auszählung der hochkonzentrierten Salzlösungen. Es war das einzige Lösungsmittel, bei dem 1 ml Eluat der Harnstoffsäule (siehe unten) in der Kälte in Lösung blieb. Gezählt wurde in Plastikröhrchen der Firma CHEDDITE PLASTIC AG, LIESTAL.

a	b	a	b	a	b
0,1	99,0	3,1	78,5	6,1	63,5
0,2	98,5	3,2	78,0	6,2	63,0
0,3	98,0	3,3	77,5	6,3	62,5
0,4	97,0	3,4	77,0	6,4	62,0
0,5	96,0	3,5	76,5	6,5	61,5
0,6	95,5	3,6	76,0	6,6	61,0
0,7	94,5	3,7	75,5	6,7	60,5
0,8	94,0	3,8	74,5	6,8	60,0
0,9	93,0	3,9	74,0	6,9	60,0
1,0	92,5	4,0	73,5	7,0	59,5
1,1	91,5	4,1	73,0	7,1	59,0
1,2	90,5	4,2	72,5	7,2	58,5
1,3	90,0	4,3	72,0	7,3	58,0
1,4	89,0	4,4	71,5	7,4	58,0
1,5	88,0	4,5	71,0	7,5	57,7
1,6	87,5	4,6	70,5	7,6	57,0
1,7	87,0	4,7	69,5	7,7	56,5
1,8	86,5	4,8	69,0	7,8	56,5
1,9	86,0	4,9	68,5	7,9	56,0
2,0	85,0	5,0	68,0	8,0	55,5
2,1	84,5	5,1	67,5	8,1	55,0
2,2	84,0	5,2	67,0	8,2	55,0
2,3	83,5	5,3	66,5	8,3	54,5
2,4	82,5	5,4	66,5	8,4	54,0
2,5	82,0	5,5	66,0	8,5	53,5
2,6	81,0	5,6	65,5	8,6	53,5
2,7	80,5	5,7	65,0	8,7	53,0
2,8	80,0	5,8	64,5	8,8	53,0
2,9	79,5	5,9	64,0	8,9	52,5
3,0	79,0	6,0	63,5	9,0	52,0

Tab. 5: Korrektur der Selbstabsorption. a = mg plattiertes Material, b = % Zählausbeute

Durch entsprechende Vergleichslösungen im Röhrchen wurde zunächst in wiederholten Zählungen der Nullwert bestimmt und für ^{3}H und ^{14}C eingestellt. Dann wurde eine definierte Menge ^{14}C-Toluol-Standard (NEW ENGLAND NUCLEAR COOP), bzw. PACKARD TRITIATED TOLUENE als Tritiumstandard zupipettiert und, wie vorgeschrieben, die Zahlen für die Dpm-Auswertung im AAA-Teil der Maschine eingestellt.
Dadurch druckt der Apparat für jede Zählung automatisch die richtigen Dpm-Werte für ^{3}H und ^{14}C aus.

7.13 Vorbehandlung der Chromatographiesäulen

7.13.1 Säulenpräparation

Das Säulenmaterial, DEAE-Cellulose von SERVA ENTWICKLUNGS-LABOR, HEIDELBERG, Kapazität 0,8, wurde 5 mal in entlüftetem, dest. H_2O aufgeschlämmt und das flottierende Material jeweils nach 20 Min. dekantiert.

Nach Füllen der Säule mit entlüftetem dest. H_2O und Einführen eines kleinen Pfropfs nasser, ungebleichter Watte zum Verschließen des Auslaufs wurde ein Teil des Wassers durch Öffnen des Hahns herausgelassen und konzentrierte DEAE-Celluloseaufschlämmung bis zum Rand eingefüllt.

Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt.
Nun wurde der Hahn nur so weit geöffnet, daß die Säule langsam tropfte und so lange immer verdünntere Celluloseaufschlämmung zugegeben, bis das Säulenmaterial 10% höher als später gewünscht eingefüllt war.

7.13.2 Regenerieren des Säulenmaterials

Die Säule wurde erst an ein Gefäß mit 1%iger NaOH-Lösung, dann an eines mit 1%iger HCl angeschlossen, bis basische

bzw. saure Lösung die Säule verließ. Dazwischen wurde mit 50 ml dest. H_2O gespült.
Dann wurde dest. H_2O und schließlich der Puffer vorgelegt, mit dem die Säule äquilibriert werden sollte.

7.13.3 Säulenchromatographie

Die zu trennenden Substanzen wurden in wässriger Lösung vorsichtig aufgetragen und einsickern gelassen. Das Durchspülen der Säulen mit Elutionsmitteln aus dem Vorrats- bzw. Gradientengefäß erfolgte in einigen Fällen (kurze Säulchen) durch hydrostatischen Druck, oder durch regelmäßig laufende peristaltische Pumpen in Verbindung mit einer Schaltuhr am Fraktionssammler.
In den meisten Fällen wurde gleichzeitig die relative Extinktion des Eluats mit einem Durchflußspektrophotometer Uvicord (LKB, STOCKHOLM) bei 280 nm bzw. 260 nm bei erhöhter Empfindlichkeit gemessen. Je nach erforderlicher Trennschärfe wurden Fraktionen von 3 bis 10 ml geschnitten.

7.14 Durchführung der Tests zur Feststellung von Spezifitätsunterschieden der tRNA-Methyltransferasen bei Arbeiterin und Königin

Die zwanzigfache der bisher pro Test verwendete Enzymmenge aus sich gerade anfärbenden Arbeiterinnenpuppen (Pmd-Ph) wurde mit 693 mµMol (Methyl-^{14}C)-SAM (52 mC/mMol) und 0,25 ml der Methyl-Mangel E. coli tRNA-Präparation (S. 38) inkubiert.
Genauso wurde mit Enzymen aus Königinnenpuppen und 0,8 ml (Methyl-^{3}H)-SAM (Donormischung S. 42) verfahren.

7.14.1 Rückgewinnung der Nucleinsäure

Beide Inkubationsansätze wurden auf 0°C abgekühlt, vereinigt und zur Chromatographie auf eine mit m/100 Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, äquilibrierte DEAE-Cellulosesäule (30 x 1,8 cm) aufgetragen. Nach Herunterspülen des nicht adsorbierten Materials wurden mit einem Kochsalzgradienten von 0 m bis 1 m die Nucleinsäuren in den Fraktionen 51 - 78 abgetrennt (vgl. S. 20f). Die vereinigte Nucleinsäurelösung wurde zur Entfernung des NaCl 3 mal gegen dest. H_2O dialysiert, bei 25°C bis zu einem Volumen von 13 ccm einrotiert, mit Kaliumacetat versetzt und mit Äthanol gefällt (vgl. S. 30).
Der Niederschlag wurde 20 Min. in der CHRIST-Zentrifuge abzentrifugiert, einmal mit Äthanol gewaschen und in 2 ml (m/200 EDTA) H_2O aufgenommen.

7.14.2 Enzymatische Spaltung

7.14.2.1 Spaltung der Nucleinsäure mit T_1-RNase

Man ließ 1000 Enzymeinheiten Ribonuclease T_1 (SANKYO, TOKIO) bei pH 7,5 und 37° C drei Std. lang unter ständigem Rühren (solange der Autotitrator den pH angleicht, ist die Reaktion noch nicht abgeschlossen) auf die RNA einwirken (ZACHAU et al. 78, 223, 1966).

7.14.2.2 Phosphomonoesterasespaltung

Die getrockneten Oligonucleotide wurden mit 0,05 ml aus einem Gemisch 0,02 m Lösungen von Ammoniumcarbonat mit Ammoniumbicarbonat in m/100 $MgCl_2$, pH 8,1, mit 0,3 Ein-

heiten (0,005 ml) PME+ aus E. coli in mit Folien verschlossenen Gefäßen bei 37°C inkubiert (ZACHAU et al. 78, 215, 1966).

7.14.2.3 Phosphodiesterasespaltung

Die nach der Spektrophotometrie gefriergetrockneten Nucleotide wurden mit 0,7 Einheiten (noch PME enthaltender) PDE++ (WORTHINGTON) in 60 µl 0,02 m Ammoniumcarbonat/Ammoniumbicarbonat-Puffer in m/100 $MgCl_2$, pH 7,5, in einem an beiden Enden zugeschmolzenen Glasröhrchen (Schmelzpunktröhrchen) 15 Std. bei 37°C inkubiert (ZACHAU et al. 78, 214f).

7.14.3 Auftrennung der Nucleotide

Sofort nach T_1-RNase-Spaltung (s.S. 48) wurden die Oligonucleotide auf eine DEAE-Cellulosesäule (96 x 1 cm) aufgetragen, die vorher mit m/100 Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, und 7 m Harnstoff äquilibriert worden war. Mit 500 ml Kochsalzgradienten, 0 m bis 0,3 m, wurden die Mono- und Oligonucleotide langsam eluiert. Die bei 260 nm absorbierenden Peaks wurden im Scintillationszähler diskriminierend gezählt und das $^3H/^{14}C$-Verhältnis berechnet (siehe auch S. 23 u. Abb. 10).

7.14.4 Entsalzung der Nucleotide

Einige Fraktionen der Harnstoffsäule wurden mit doppeltem Volumen dest. H_2O verdünnt und auf kleinen, mit 0,03 m Ammoniumcarbonat/Ammoniumbicarbonat-Puffer, pH 8,6, äqui-

---

+ PME = Phosphomonoesterase, für die Überlassung einer Probe danke ich Herrn Prof. ZACHAU

++ PDE = Phosphodiesterase

librierten, vorher mit 1,25 m Ammoniumcarbaminat gespülten DEAE-Cellulosesäulen (8 x 0,5 cm) harnstoff- und chloridfrei gewaschen.
Die Nucleotide wurden mit einem Gemisch einmolarer Lösungen aus Ammoniumcarbonat und Ammoniumbicarbonat, pH 8,6, eluiert und der Puffer wiederholt im Exsiccator so eingedampft, daß möglichst salzfreie Nucleotide vorlagen.

7.14.5 Hochspannungs-Papierelektrophorese

(in Anlehnung an DÜTTIG u. ZACHAU (21, 574, 1964))
Jeweils drei aufzutrennende Nucleotidfraktionen wurden nach PME-Spaltung (S.48f) etwa auf der Mittellinie des Papiers (50 x 28 cm, SCHLEICHER-SCHÜLL) einzeln mit einem vierten Referenzfleck aus 5'Up, 5'Gp, 5'Ap und 5'Cp in 5 cm Abstand mit einer Kapillare aufgetragen.

Dann wurde die Absorption mit einer UV-Lampe kontrolliert und 4000 V bei 40 mA angelegt. Als Pufferlösung wurde Ammoniumformiat, pH 2,7, verwendet (S. 42).

Nach 50 und 80 Min. wurde die Elektrophorese zur Kontrolle der Laufstrecke kurz unterbrochen; nach ca. 1 1/2 Std. war die Elektrophorese beendet. Das Papier wurde hängend bei Zimmertemperatur getrocknet.

7.14.6 Elution der Elektrophoreseflecken

Die Flecken wurden ausgeschnitten, zusammengerollt in EPPENDORFF-Pipettenaufsätze gesteckt, die sich einzeln in Zentrifugengläsern befanden, von oben her mit einem Tropfen dest. H_2O befeuchtet und 7 Min. in der CHRIST-Zentrifuge abzentrifugiert. Das Befeuchten und Zentrifugieren wurde 4 mal wiederholt.
Auf diese Weise wurde mehr als 95% des aufgetragenen Materials eluiert.

7.14.7 Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Nucleotid-Lösungen mit einem $OD_{260\ nm}$ Gehalt von über OD 0,2 wurden nach PDE-Spaltung (S. 49) auf Dünnschicht-Cellulose-Glasplatten mit Fluoreszenzindikator (20 x 20 cm, MERCK, DARMSTADT) aufgetragen und mit einem Referenzfleck aus Ribosyl-Pseudouridin und den vier Normal-Nucleosiden zweidimensional chromatographiert.
Das Lösungsmittel für die erste Dimension war Isopropanol: H_2O wie 7:2 (v/v) und für die zweite Dimension Isopropanol: H_2O:konz. NH_3 wie 7:2:1 (v/v/v) (HACKER u. MANDEL 28, 49, 1969). Die Laufzeit betrug für jede Dimension bis zu 12 Std..

7.15 Spektrophotometrie

Die Elektrophoreseflecken wurden im Spektrophotometer der Fa. CARY Typ 15 vermessen. Dazu wurde von jedem eluierten Fleck ein gleichgroßes Stück Elektrophoresepapier gleicher Laufstrecke auf dieselbe Weise eluiert (vgl. S. 50). Beide Elutionslösungen wurden mit dest. H_2O auf 1 ml aufgefüllt und der Fleck gegen die Kontrolle spektrophotometrisch erst im Neutralen, dann unter Zusatz von 0,02 ml m/100 HCl vermessen.
Weitere Spektren, Extinktionsmessungen der Fraktionen, Lowrybestimmung wurden mit dem selbstregistrierenden Spektralphotometer SP 800 (LEITZ - UNICAM) und dem Multipurpose Recording Spectrophotometer MPS - 50 L (SHIMADZU), sowie im Spektralphotometer PMQ 2 (ZEISS), gemessen.

7.16 Autoradiographie

Einige Dünnschichtplatten wurden viermal mit einem Intensifier (Omnispray, PACKARD, FRANKFURT) besprüht und drei Monate auf eine Röntgenplatte (AGFA, MÜNCHEN) gepreßt.

Die Platten wurden 5 Min. entwickelt (AGFA G 230) und 20 Min. in allgemein gebräuchlicher Fixierlösung (FISCHER u. WERNER 23, 144, 1971) fixiert. Die Zuordnung der geschwärzten Stellen im Chromatogramm wurde durch deckungsgleiche Photoplatten und radioaktive Markierungsflecken erreicht.

7.17 Spezielles

pH-Werte wurden mit einer Einstabelektrode (Radiometer, Kopenhagen) gemessen.
An weiteren wichtigen Geräten wurde verwendet: Rotationsverdampfer, Schüttelinkubator mit Flüssigkeitsthermostat, CHRIST-Kühlzentrifuge.

Literaturverzeichnis

Die hier verwendeten Abkürzungen für Zeitschriften entsprechen i. allg. den in von M. PFLÜCKE und A. HAWELEK herausgegebenen "Periodica Chimica" (1952 und Nachtrag 1961, Verlag Chemie, Weinheim) zitierten internationalen Abkürzungen.

1. R.J.L. Allen: "The Estimation of Phosphorus", Biochem. J. 34, 858-865 (1940)

2. B.C. Baguley, M. Staehelin: "The Specifity of Transfer Ribonucleic Acid Methylases from Rat Liver", Biochemistry 7, 45-50 (1968)

3. B.C. Baguley, M. Staehelin: "Substrate Specifity of Adenine-Specific Transfer RNA Methylase in Normal and Leucemic Tissues", Europ. J. Biochem. 6, 1-7 (1968)

4. B.C. Baguley, M. Staehelin: "A Comparison of 1-Methyladenine-Containing Sequences in Transfer Ribonucleic Acid from Yeast and from Rat Liver", Biochemistry 8, 257-262 (1969)

5. B.C. Baguley, W. Wehrli, M. Staehelin: "In vitro Methylation of Yeast Serine Transfer Ribonucleic Acid", Biochemistry 9, 1645-1649 (1970)

6. B.S. Baliga, P.R. Srinivasan, E. Borek: "Changes in the tRNA Methylating Enzymes during Insect Metamorphosis", Nature (London) 208, 555-557 (1965)

7. J. Barlow, A.P. Mathias: "The Isolation of Ribosomal RNA from Mammals", 445-454, in G.L. Cantoni & D.R. Davies (Herg.) "Procedures in Nucleic Acid Research", Harper & Row, Publishers, New York and London, 1966

8. P. Berg, E.J. Ofengand: "An Enzymatic Mechanism for Linking Amino Acids to RNA", Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 78-86 (1958)

9. F.H. Bergmann, P. Berg, M. Dieckmann: "The Enzymatic Synthesis of Amino Acyl Derivates of Ribonucleic Acid II. The Preparation of Leucyl-, Valyl-, Isoleucyl- and Methyonyl Ribonucleic Acid Synthetases from Escherichia coli", J. biol. Chemistry 236, 1735-1740 (1961)

10. P.L. Bergquist, R.E.F. Matthews: "Distribution of Methylated Purines in Cell Fraction from Mouse Liver and Tumor", Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 34, 567-569 (1959)

11. P.L. Bergquist, R.E.F. Matthews: "Occurrence and Distribution of Methylated Purines in the Ribonucleic Acids of Subcellular Fractions", Biochem. J. 85, 305-313 (1962)

12. D. Bernhardt, J.E. Darnell jun.: "tRNA Synthesis in HeLa Cells: A Precursor to tRNA and the Effects of Methionine Starvation on tRNA Synthesis", J. molecular Biol. 42, 43-56 (1969)

13. M.L. Birnstiel, E. Fleissner, E. Borek: "Nucleolus: A Center of RNA Methylation", Science (Washington) 142, 1577-1580 (1963)

14. E. Borek, A. Ryan, J. Rockenbach: "Nucleic Acid Metabolism in Reaction to the Lysogenic Phenomenon", J. Bacteriol. 69, 460-467 (1955)

15. G.L. Cantoni, H.H. Richards: "Preparation of sRNA from Yeast" 624-628 in loc. cit. 7, New York and London 1966

16. D.J. Capra, A. Peterkofski: "The Coding Properties of Methyl-deficient Leucyl-transfer RNA", J. molecular Biol. 21, 455-465 (1966)

17. J. Christman, E. Borek: "Organ Specifity of the tRNA Methylases", Federat. Proc. 26, 867 (1967)

18. U. Clever, P. Karlson: "Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch Ecdyson", Exp. Cell Res. 20, 623-626 (1960)

19. C. Czoppelt, H. Rembold: "Vergleichende Analyse des Kohlenhydratstoffwechsels bei den Kasten der Honigbiene, Apis mellifera", J. Insect Physiol. 16, 1249-1264 (1970)

20. D.B. Dunn, J.D. Smith, P.F. Spahr: "Nucleotide Composition of Soluble Ribonucleic Acid", J. molecular Biol. 2, 113-117 (1960)

21. D. Düttig, H.G. Zachau: "Spaltung einer serinspezifischen Transferribonucleinsäurefraktion mit T_1 Ribonuclease", Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 91, 573-583 (1964)

22. G. v. Ehrenstein, F. Lipman: "Experiments on Hemoglobin Biosynthesis", Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 941-950 (1961)

23. H.A. Fischer, G. Werner: "Autoradiographie", Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1971

24. E. Fleissner, E. Borek: "A new Enzyme of RNA Synthesis: RNA Methylase", Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1199-1203 (1962)

25. D. Fraser, E.A. Jerrel: "The Amino Acid Composition of T_3 Bacteriophage", J. biol. Chemistry 205, 291-295 (1953)

26. M. Gold, J. Hurwitz, M. Anders: "The Enzymatic Methylation of RNA and DNA II. On the Species Specifity of the Methylation Enzymes", Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 164-169 (1963)

27. H. Graf, "Isolierung und Charakterisierung eines kastenspezifischen Proteins aus der Honigbiene Apis mellifica L., Dissertation 1970, München

28. B. Hacker, R.L. Mandel: "Altered Transfer RNA Methylase Patterns induced by an Avian Oncogenic Virus", Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 190, 38-51 (1969)

29. R.L. Hancock: "Utilization of L-Methionine and S-Adenosyl-L-Methionine for Methylation of Soluble RNA by Mouse Liver and Hepatoma Extracts", Cancer Research 27, 646-653 (1967)

30. R.L. Hancock, P. McFarland, R.R. Fox: "sRNA Methylase Activity of Embryonic Liver", Experientia (Basel) 23, 806-807 (1967)

31. A.E. Harper: "Glucose-6-phosphatase" 788-792 in H.H. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse", Verlag Chemie, Weinheim 1962

32. M. B. Hoagland, M.L. Stephenson, J.F. Scott, L.I. Hecht, P.C. Zamecnik: "A Soluble Ribonucleic Acid Intermediate in Protein Synthesis, J. biol. Chemistry 231, 241-257 (1958)

33. J. Hurwitz, M. Gold, M. Anders: "The Enzymatic Methylation of Ribonucleic Acid and Deoxyribonucleic Acid III. Purification of Soluble Ribonucleic Acid Methylating Enzymes", J. biol. Chemistry 239, 3462-3473 (1964)

34. J. Hurwitz, M. Gold, M. Anders: gleicher Titel IV. The Properties of the Soluble Ribonucleic Acid Methylating Enzymes, ebenda 3474-3482 (1964)

35. J. Ilan, J. Ilan, N. Patel: "Juvenile Hormone Determination of Translational Control through transfer Ribonucleic Acid and Enzyme", J. biol. Chemistry 245, 1275-1281 (1970)

36. A.M. Kaye, P.S. Leboy: "Methylation of RNA by Mouse Organs and Tumors: Ionic Stimulation in vitro", Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 157, 289-302 (1968)

37. S.J. Kerr: "Natural Inhibitors of the Transfer Ribonucleic Acid Methylases", Biochemistry 9, 690-695 (1970)

38. F.W. Küster, A. Thiel, K. Fischbeck: "Logarithmische Rechentafeln für Chemiker, Pharmazeuten, Mediziner und Physiker", 84.-93. Aufl. Walter de Gruyter Verlag, Berlin 1962

39. H. Lineweaver, D. Burk: "The Determination of Enzyme Dissociation Constants", J. Amer. chem. Soc. 56, 658-666 (1934)

40. M. Liss, A.M. Maxam, L.J. Cuprak: "Methylation of Protein by Calf Spleen Methylase. A new Protein Methylation Reaction", J. biol. Chemistry 244, 1617-1622 (1969)

41. U.Z. Littauer, M. Revel, R. Stern: " Coding Properties of Methyl-Deficient Phenylalanine Transfer RNA", 501-514 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 31, im Selbstverlag (1966)

42. T.P. Liu, S.E. Dixon: "Studies on the Mode of Action of Royal Jelly in Honey Bee Development VI. Haemolymph Protein Changes during Caste Development", Canad. J. Zool. 43, 873-879 (1965)

43. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, L.A. Farr, R.J. Randall: "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", J. biol. Chemistry 193, 265-275 (1951)

44. M. Lüscher: "Die Bedeutung des Juvenilhormons für die Differenzierung der Soldaten bei der Termite Kalothermes flavicollis", 165-170, in Proc. VI. Congr. IUSSI, Bern 1969

45. L. Lumper: "Grundlagen der Kinetik enzymatisch katalysierter Reaktionen", 17-84, in Hoppe-Seyler/Thierfelder: "Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse" 10. Aufl. Bd. 6 A, Springer Verlag, Berlin 1964

46. L.R. Mandel, E. Borek: "Variability in the Structure of Ribonucleic Acid", Biochem. biophysic. Res. Commun. 4, 14-18 (1961)

47. L.R. Mandel, E. Borek: "The Source of Methylgroup for the Thymine of RNA", ebenda 6, 138-140 (1961)

48. V.L. Morris, E.K. Wagner, B. Roizman: "RNA Synthesis in Cells Infected with Herpes Simplex Virus III. Absence of Virus-specified Arginyl- and Seryl-tRNA in Infected HEp-2 Cells", J. molecular Biol. 52, 247-263 (1970)

49. K. Murray: "The Occurrence of ε-N-methyl-Lysine in Histones", Biochemistry 3, 10-15 (1964)

50. M.W. Nirenberg, J.H. Matthaei, O.W. Jones: "An Intermediate in the Biosynthesis of Polyphenylalanine directed by synthetic Template RNA", Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 104-109 (1962)

51. M. Osanai, H. Rembold: "Entwicklungsabhängige mitochondriale Enzymaktivitäten bei den Kasten der Honigbiene", Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 162, 22-31 (1968)

52. B. Pace, R.L. Peterson, N.R. Pace: "Formation of all stable RNA Species in E. coli by Post-transcriptional Modification", Proc. nat. Acad. Sci. USA 65, 1097-1104 (1970)

53. W.K. Paik, S. Kim: "Protein Methylase I. Purification and Properties of the Enzyme", J. biol. Chemistry 243, 2108-2114 (1968)

54. A. Peterkofsky, C. Jesensky, A. Bank, A.H. Mehler: "Studies on the Role of Methylated Bases in the Biological Activity of Soluble Ribonucleic Acid", J. biol. Chemistry 239, 2918-2926 (1964)

55. G. Pfleiderer: "Glycogen Bestimmung als D-Glucose mit Hexokinase, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase", 59-62, in H.U. Bergmeyer "Methoden der enzymatischen Analyse", Verlag Chemie, Weinheim 1962

56. V.R. Potter, C.A. Elvehjem: "A modified Method for the Study of Tissue Oxydations", J. biol. Chemistry 114, 495-504 (1936)

57. U.L. RajBhandary, A. Stuart, S.H. Chang: "Studies on Polynucleotides LXXX. Yeast Phenylalanine Transfer Ribonucleic Acid: Products obtained by Radiation with Ribonuclease T_1", J. biol. Chemistry 243, 584-591 (1968)

58. H. Rembold, G. Hanser: "Nachweis des determinierenden Prinzips im Futtersaft der Königinnenlarven", Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 339, 251-254 (1964)

59a. H. Rembold: "Biochemie der Kastenbildung bei der Honigbiene"; Vortrag auf dem XXVII. internationalen Bienenzüchterkongreß, München 1969

59b. H. Rembold: "Biochemie bei der Kastenentstehung der Honigbiene", 239-246, in loc. cit. 44, Bern 1969

60. M. Revel, U.Z. Littauer: "The Coding Properties of Methyldeficient Phenylalanine Transfer RNA from Escherichia coli", J. molecular Biol. 15, 389-394 (1966)

61. R. Rodeh, M. Feldmann, U.Z. Littauer: "Properties of Soluble Ribonucleic Acid Methylases from Rat Liver", Biochemistry 6, 451-460 (1967)

62. G.H. Schmidt: "Photoactive Substanzen in verschieden praedisponierten Eiern und Junglarven von Formica polyctena Foerst.", 257-261 loc. cit. 44 Bern 1969

63. R. Silber, E. Bergmann, B. Goldstein, H. Stein, G. Farnham, J.R. Bertino: "Methylation of Nucleic Acids in Normal and Leucemic Leucocytes", Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 123, 638-640 (1966)

64. D.F. Silbert, G.R. Fink, B.N. Ames: "Histidine Regulatory Mutants in Salmonella thyphimurium III. A Class of Regulatory Mutants Deficient in tRNA for Histidine", J. molecular Biol. 22, 335-347 (1966)

65. L.N. Simon, A.J. Glasky, T.H. Rejal: "Enzymes in the Central Nervous System", Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 142, 99-104 (1967)

66. R.E. Snodgrass: "Anatomy of the Honey Bee", Comstock Publishing Associates, Ithaca New York 1956

67. P.R. Srinivasan, E. Borek: "The Species Variation of RNA Methylation", Proc. nat. Acad. Sci. USA 49, 529-533 (1963)

68. J.L. Starr: "The Incorporation of Amino Acids into "Methylpoor" Amino Acid Transfer Ribonucleic Acid", Biochem. biophysic. Res. Commun. 10, 181-185 (1963)

69. G.S. Stent, S. Brenner: "A genetic Locus for the Regulation of Ribonucleic Acid Synthesis", Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 2005-2014 (1961)

70. M. Steiner: "Herstellung und Überprüfung der geeigneten Reaktionsbedingungen", 761-833, in Bamann und Myrbäck (Herg.) "Methoden der Fermentforschung" Bd. I, Thieme Verlag, Leipzig 1941

71. N. Sueoka, T. Kano-Sueoka, W.J. Gartland: "Modification of sRNA and Regulation of Protein Synthesis", 571-580 in loc. cit. 41, Cold Spring Harbor, New York 1966

72. S. Takemura, T. Mizutani, M. Miyazaki: "The primary Structure of Valine I Transfer Ribonucleic Acid from Torulopsis utilis I. Complete Digestion with Pancreatic Ribonuclease and Ribonuclease T_1", J. Biochemistry (Tokyo) 64, 827-837 (1968)

73. P. Traub, W. Zillig: "Untersuchungen zur Biosynthese der Proteine, VI. Eine neue Methode zur Darstellung eines zellfreien Systems aus Escherichia coli und deren Eigenschaften in der nucleinsäureabhängigen Proteinsynthese", Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 343, 246-260 (1966)

74. A.R. Trim, J.E. Parker: "Preparation, Purification and Analysis of thirteen alkalistable Dinucleotides from Yeast Ribonucleic Acid", Biochem. J. 116, 589-598 (1970)

75. E. Volkin, W.E. Cohn: "Estimation of Nucleic Acids", 287-305, in D. Glick (Herg.) "Methods of Biochemical Analysis Bd. I", Interscience Publishers, New York 1956

76. H.J. Vogel, D.M. Bronner: "Acetylornithinase of Escherichia coli: Partial Purification and some Properties", J. biol. Chemistry 218, 97-106 (1956)

77. G. Zubay: "Isolation of Transfer RNA", 455-460 in loc. cit. 7, New York and London 1966

78. H.G. Zachau, D. Düttig, H. Feldmann: "The Structures of Two Serine Transfer Ribonucleic Acids", Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 347, 212-235 (1966)

79. H.G. Zachau: "Zur Struktur und Funktion von Transfer-Ribonucleinsäuren", Angew. Chem. 81, 645-662 (1969)

Lebenslauf

Am 9.7.1940 wurde ich, Heinrich Richard Henschel, als Sohn des Studienrates Reinhard Henschel und dessen Ehefrau Anna, geb. Krützfeldt in Tschenstochau (Polen) geboren. Nach der Flucht besuchte ich von 1946 bis 1951 die Volksschule in Au bei Aibling und anschließend bis zum Abitur 1961 die staatliche Oberrealschule in Rosenheim (jetzt Finsterwalder-Gymnasium).

Im selben Jahr schrieb ich mich an der Universität München ein, studierte die Fächer Chemie, Biologie und Erdkunde und legte in diesen Fächern in den Jahren 1965 und 1966 in München die wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien ab.

Anschließend, im November 1966, begann ich mit der vorliegenden Arbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie. Ab September 1970 bin ich als Studienreferendar im Schuldienst eingesetzt.